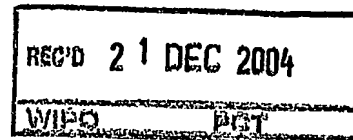


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EP04/12556



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 56 837.9

Anmeldetag: 05. Dezember 2003

Anmelder/Inhaber: Genovoxx GmbH, 23562 Lübeck/DE;
Dmitry Cherkasov und
Dr. Christian Hennig, 23562 Lübeck/DE.

Bezeichnung: Modifizierte Nukleotide und Nukleoside

IPC: C 07 H, C 12 Q, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. November 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hoiß

München · Hamburg · Düsseldorf
New York

Patentanwälte

Dr. Walter Maiwald (München)
Dr. Volker Hamm (Hamburg)
Dr. Stefan Michalski (Düsseldorf)
Dr. Regina Neuefeind (München)
Dipl.-Ing. Udo Preuss (München)
Dipl.-Ing. Korbinian Kopf, M.A. (München)
Dr. Norbert Hansen (München)
Dipl.-Ing. Lutz Kietzmann LL.M. (Düsseldorf)
Dr. Martin Huenges (München)
Dr. Holger Glas (München)
Dr. Vera Tietbrunner (München)
Dr. Sigrid von Krosigk (Hamburg)

Rechtsanwälte

Stephan N. Schneller (München)
Matthias Gottschalk, MBA (München)

In Kooperation mit:

Maiwald Inc.,
European IP Services, New York
Dipl.-Ing. Korbinian Kopf, M.A.
U.S. Patent Agent

Aktenzeichen
Neuanmeldung
GENOVOXX GMBH

Unser Zeichen
G 7279 / RN

München,
5. Dezember 2003

Genovoxx GmbH

Innovationscampus Lübeck, 23562 Lübeck

et al.

Modifizierte Nukleotide und Nukleoside

Die vorliegende Erfindung betrifft modifizierte Nukleotide und Nukleoside, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie die Verwendung dieser modifizierten Nukleotide und Nukleoside insbesondere zur Markierung von Nukleinsäuren.

Nukleotide und Nukleoside spielen eine zentrale Rolle in unterschiedlichen Stoffwechselvorgängen der lebenden Organismen (siehe G. Löffler, "Biochemie und

MH:aw

Pathobiochemie", 2003) und sind weit verbreitete Bausteine in der modernen Biotechnologie (siehe u.a. J. Sambrook et al., "Molecular Cloning", Band 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, ISBN 0-87969-576-5, 2001), beispielsweise in künstlichen Detektionssystemen basierend auf Microarrays (siehe Bowtell, "DNA Microarrays", ISBN 0-87969-624-9, 2003; M. Schena, "Microarray-Biochip Technology", ISBN 1-881299-37-6, 2000). Ferner werden auch modifizierte Nukleotide und Nukleotid-Analoga in unterschiedlichen Bereichen der Biotechnologie, Medizin und Pharmakologie eingesetzt (siehe Scheit, "Nucleotide Analogs", ISBN 0-471-04854-2, 1980; Kisakürek, "Nucleoside and Nucleic Acid Chemistry", 2000; Mitsuya, "Anti-HIV Nucleosides", 1997; Cheson, "Nucleoside Analogs in cancer therapy", 1997).

Eines der wichtigsten Felder der modernen Life Science sind Analysen von Nukleinsäuren. Ein großer Bereich dieser Analysen befasst sich mit dem Nachweis von Nukleinsäuren oder deren Bestandteilen in biologischen Proben. In vielen Fällen wird zu diesem Zweck ein Reaktionspartner markiert, der mit der zu analysierenden Nukleinsäure reagieren kann. Dem Fachmann sind unterschiedliche Möglichkeiten zur Markierung der Nukleinsäuren bekannt. Es können sowohl einzelne Nukleinsäurebausteine, Nukleotide bzw. Nukleoside modifiziert sein als auch kurze Fragmente von Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder Polynukleotide zum Nachweis eingesetzt werden.

Modifizierte Nukleotide sind beispielsweise in Lee et al., Nucleic Acid Research 1992, 20, 2471; Augustin et. al., J. Biotechnology 2001, 86, 289-301; Held et al., Nucleic Acid Research 2002, 30, 3857 sowie im US-Patent 4,828,979 beschrieben. Die dort offenbarten Nukleotide weisen eine niedermolekulare detektierbare Einheit auf, die, wie ein Fluoreszenzfarbstoffmolekül, direkt oder, wie ein Biotin-Molekül, das erst nach Kopplung mit einem Streptavidin-Farbstoff-Konjugat nachweisbar ist, indirekt detektiert werden kann.

Zahlreiche modifizierte Nukleotide können kommerziell erworben werden, wie z.B. Biotin-11-dUTP, DNP-11-dATP, Fluorescein-12-dCTP (NEN Life Science Products,), dCTP-Cy3, dCTP-Cy5 (Amersham Bioscience) oder Biotin-16-dUTP (Roche, Mannheim, Deutschland). Entsprechende Nachweisreagenzien, wie z.B. markiertes Streptavidin oder markierte Antikörper, können von denselben Anbietern bezogen werden. Modifizierte Nukleoside für den Nachweis von Nukleinsäuren sind z.B. von Trilink Biotechnologies, Eurogentec und MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) erhältlich.

Die bekannten modifizierten Nukleotide weisen üblicherweise ein äquimolares Verhältnis zwischen Nukleotid-Komponente und den niedermolekularen detektierbaren Einheiten, z.B. einem Farbstoff-Molekül oder einem Biotin-Molekül, auf. Nukleotid-Komponente und detektierbare Einheit sind herkömmlicherweise durch einen Linker mit einer durchschnittlichen Länge von 5 bis 30 Kohlenstoff-Atomen verbunden

Derartige Nukleotide werden als Substrate von Polymerasen erkannt und können so in einen wachsenden DNA- oder RNA-Strang eingebaut werden. Auf diese Weise kann ein signaltragendes Molekül wie ein Farbstoff oder ein signalvermittelndes Molekül wie Biotin oder Digoxigenin in eine Nukleinsäurekette eingeführt werden. Nach dem Einbau von derart modifizierten Nukleotiden erfolgt die Signaldetektion bei Verwendung eines farbstoffmarkierten Nukleotids direkt oder bei Verwendung eines signalvermittelnden Moleküls wie Biotin nach Inkubation mit einem sekundären signaltragenden Molekül wie einem Streptavidin-Farbstoff-Konjugat. Die nachträgliche Kopplung von signaltragenden Molekülen wie Streptavidin erfolgt allerdings oft nur mit unzureichenden Ausbeuten von 20-60%.

Sowohl bei der Analyse von Nukleinsäuren mittels herkömmlicher Microarray-Verfahren als auch insbesondere bei der Detektion der Signale einzelner Nukleotidmoleküle (siehe z.B. WO 00/18956 und WO 02/072892) unter Verwendung der im Stand der Technik beschriebenen Nukleotide beeinträchtigen mehrere Phänomene wie z.B. das Ausbleichen der

Farbstoffe oder Blinking die Qualität der Ergebnisse. Für solche Verfahren bedeuten eine Steigerung von Signalstärke und Intensität der Nukleotidmarkierung eine Verringerung der Fehlerrate bei der Detektion.

Zur Gewährleistung einer ausreichenden Signalstärke wurden bislang bei der Markierung von Nukleinsäuren Signalvervielfältigungsschritte durchgeführt. Diese können auf unterschiedlichen Stufen der Analyse durchgeführt werden. Beispiele dafür sind die Vervielfältigung der Nukleinsäuren durch PCR, der mehrfache Einbau von markierten Nukleotiden oder die mehrstufige nachträgliche Markierung von Biotin-Nukleotiden (J. Sambrook et al., 2001, siehe oben). Diese Signalverstärkungsverfahren führen allerdings zu einer Verzerrung der Signale, da sie aus mehreren, oft nicht hinreichend kontrollierbaren Schritten bestehen, die mit unterschiedlichen Ausbeuten ablaufen und durch viele äußere Faktoren beeinflussbar sind.

Die Herbeiführung der gewünschten Signalverstärkung durch Einsatz von mehrfach markierten Nukleotiden bei der Nukleinsäuresynthese erweist sich in Kombination mit herkömmlich modifizierten Nukleotiden als äußerst nachteilig. Zwar können solche Nukleotide ohne größeren Aufwand hergestellt werden, sie verlieren aber ihre Funktion als Substrat für Polymerasen und andere Enzyme. Die Ursache dafür liegt in der Veränderung der Eigenschaften der Nukleotide in Folge der Kopplung an mehrere, sterisch wesentlich anspruchsvollere Moleküle bzw. Markierungen. Die multiple Markierung von Nukleotiden beispielsweise mit mehreren Farbstoffen würde jedoch einen großen Vorteil für viele Verfahren auf dem Gebiet der Nukleinsäureanalyse darstellen.

Der Einfluss der Linkergröße, der chemischen Zusammensetzung der Linker-Einheit und der Größe und Beschaffenheit von niedermolekularen Markern auf die Substrat-Eigenschaften von Nukleotiden ist ausführlich beschrieben (siehe G. Wright et al., *Pharmac. Ther.* 1990, 47, 447; US 4,828,979; Lee et al., *Nucleic Acid Research* 1992, 20, 2471; J. Brandis, *Nucleic Acid Research* 1999, 27, 1912). Demnach können bereits geringfügige Veränderungen an der

Nukleotid-, Linker- und/oder Marker-Struktur zu einer starken Veränderung der Substrateigenschaften von derart modifizierten Nukleotide führen. Insbesondere kann die wesentliche Steigerung der Masse des Nukleotids durch Einführung makromolekularer Komponenten zur Veränderung der biochemischen und physikalischen Eigenschaften von Nukleotiden führen. Die Molekülmasse von herkömmlich modifizierten Nukleotiden liegt demnach in derselben Größenordnung wie bei nicht modifizierten Nukleotiden und ist relativ gering verglichen mit der Masse von Proteinen, wie z.B. Streptavidin oder Polymerasen.

So wurde gezeigt, dass die Kopplung eines deutlich größeren Moleküls wie z.B. eines Proteins an ein herkömmlich modifiziertes Nukleotid zur Aufhebung von dessen Substrateigenschaften führt. Deshalb konnten bislang signalverstärkende Makromoleküle erst nach erfolgtem enzymatischem Einbau der Nukleotide in eine Nukleinsäurekette mit dem Nukleotid gekoppelt werden. Eine mehrfache Markierung von Nukleotiden durch eine signalverstärkende makromolekulare Marker-Komponente unter Beibehaltung der Substrateigenschaft der Nukleotide konnte bislang nicht realisiert werden.

Es besteht somit ein Bedarf an modifizierten Nukleotiden oder Nukleosiden mit einer verbesserten signalgebenden oder signalvermittelnden Wirkung, insbesondere für deren Einsatz zur Markierung von Nukleinsäuren bei der Nukleinsäureanalyse.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist folglich die Bereitstellung von modifizierten Nukleotiden oder Nukleosiden, die ihre Substrateigenschaften für Polymerasen oder andere Enzyme beibehalten und nach ihrem Einbau in Nukleinsäuren eine verbesserte Signalintensität bei deren Analyse gewährleisten.

Insbesondere ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, modifizierte Nukleotide oder Nukleoside bereitzustellen, die mit mehr als einer Markierung koppelbar sind, ohne dabei ihre Substrateigenschaften für Polymerasen oder andere Enzyme zu verlieren.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von modifizierten Nukleotiden oder Nukleosiden, insbesondere für die Verwendung zur Markierung von Nukleinsäuren bei der Nukleinsäureanalyse, die ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis gewährleisten, beispielsweise in dem das Konzentrationsverhältnis von einzubauendem Nukleotid zu Marker erhöht wird.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Markierung von Nukleinsäuren mit einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis.

Diese und weitere Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen angegebenen Gegenstände gelöst.

Bevorzugte Ausführungsformen sind in den Unteransprüchen definiert.

Die Aufgaben werden erfindungsgemäß dadurch gelöst, dass eine Verbindung bereitgestellt wird, die mindestens eine Nukleotid- und/oder Nukleosid-Einheit umfasst, die über eine Linker-Einheit mit einer Marker-Einheit verbunden ist, wobei die Linker-Einheit mindestens 50 Kettenatome umfasst.

Die Überwindung der vorstehend beschriebenen Nachteile des Standes der Technik gelang durch die Einführung einer makromolekularen Linker-Einheit zwischen der Nukleotid- bzw. Nukleosid-Einheit und der Marker-Einheit (siehe auch Fig. 1-4).

Die Molekülmasse der erfindungsgemäßen Verbindungen kann ein Vielfaches der Masse natürlich vorkommender Nukleotide oder Nukleoside betragen, so dass eine starke Beeinflussung der Eigenschaften der Nukleotid- bzw. Nukleosid-Einheit zu erwarten war. Überraschenderweise behalten allerdings die erfindungsgemäßen Verbindungen ihre

Substrataktivität bei und können so als Substrate der jeweiligen Enzymen verwendet werden. So bauen beispielsweise Polymerasen die erfindungsgemäßen Verbindungen in eine Nukleinsäure ein. Ferner kann Terminale Deoxynucleotidyltransferase (TdT) die erfindungsgemäßen Verbindungen an das 3'-Ende einer Nukleinsäure koppeln.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen somit eine oder mehrere Nukleotid- bzw. Nukleosid-Einheiten auf, die über eine oder mehrere lange Linker-Einheiten mit einer oder mehreren signalvermittelnden oder detektierbaren, d.h. signalgebenden Einheiten bzw. Markern verbunden sind (siehe auch Fig. 1 und 2). Die Marker-Einheit ist vorzugsweise eine makromolekulare Verbindung. Die jeweilige Nukleotid- bzw. Nukleosid-Komponente bewahrt in der erfindungsgemäßen Verbindung ihre Substratfunktion und kann z.B. durch Polymerasen in einen wachsenden DNA- oder RNA-Strang eingebaut werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können wie die herkömmlichen modifizierten Nukleotide in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie und Medizin eingesetzt werden. Insbesondere sind die erfindungsgemäßen Verbindungen für die Verwendung zur Markierung von Nukleinsäuren geeignet. Andere Einsatzbereiche der erfindungsgemäßen Verbindungen umfassen die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen in der Diagnostik oder Therapie.

Unter einem herkömmlich modifizierten Nukleotid wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Nukleotid verstanden, das über eine Linker-Einheit mit einer durchschnittlichen Länge von 5 bis 30 Ketten-Atomen, insbesondere Kohlenstoff-Atomen, mit einem Marker verbunden ist. Üblicherweise trägt ein herkömmlich modifiziertes Nukleotid einen niedermolekularen Marker, wie z.B. ein Farbstoff- oder ein Biotinmolekül.

Im Gegensatz dazu sind die erfindungsgemäßen Verbindungen durch eine Kombination aus einer oder mehreren Nukleotid- und/oder Nukleosid-Einheiten, einem oder mehreren langen Linker-Einheiten und einer Marker-Einheit definiert.

Unter einer makromolekularen Verbindung wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Molekül, ein Molekülkomplex, ein Nanokristall oder ein Nanoteilchen verstanden, dessen Masse in einem Bereich von mehr als 2 kDa bis 100 kDa, vorzugsweise bis zu 200 kDa, besonders bevorzugt bis zu 1 MDa oder auch bis zu 10 MDa liegt. Bevorzugte makromolekulare Verbindungen im Sinne der vorliegenden Erfindung weisen somit eine Masse von 5kDa und mehr, 50 kDa und mehr, 150 kDa und mehr, 500 kDa und mehr auf.

Beispiele für makromolekulare Verbindungen im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Nukleinsäuren, wie z.B. Oligonukleotide mit einer Länge von mehr als zehn Nukleotiden; Polynukleotide; Polypeptid; Proteine bzw. Enzyme; Quantum-Dots; Polymere wie PEG, Polyvinylalkohol (z.B. Mowiol®) oder Polyacrylat; und/oder Nanogold-Partikel.

Unter einer niedermolekularen Verbindung wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Molekül oder Molekülkomplex verstanden, dessen Masse kleiner oder gleich 2 kDa ist.

Beispiele für niedermolekulare Verbindungen im Sinne der vorliegenden Erfindung sind natürlich vorkommende Nukleotide wie dATP, dUTP; Farbstoffe wie Cy3, Rhodamine und Fluorescein; Linker mit einer durchschnittlichen Länge von 5 bis 30 C-Atome, seltene Erden und/oder herkömmlich modifizierte Nukleotide wie Biotin-16-dUTP.

Die Nukleotid- und/oder Nukleosid-Einheiten der erfindungsgemäßen Verbindung werden im Folgenden auch als Nuk-Einheiten oder Nuk-Komponenten bezeichnet. Eine Nuk-Einheit im Sinne der vorliegenden Erfindung kann somit sowohl ein Nukleotid als auch ein Nukleosid oder ein entsprechendes Analogon darstellen. Die folgenden Ausführungen betreffend Nukleotide als Nuk-Einheiten gelten in analoger Weise für Nukleoside oder entsprechende Analoga als Nuk-Einheiten.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Nuk-Einheit ein Nukleosid. In einer weiteren Ausführungsform ist die Nuk-Einheit ein Nukleosid-Monophosphat. In einer

weiteren Ausführungsform ist die Nuk-Einheit ein Nukleosid-Diphosphat. In einer weiteren Ausführungsform ist die Nuk-Einheit ein Nukleosid-Triphosphat. Auch höhere Phosphat-Derivate wie Tetraphosphat, Pentaphosphat usw. können als Nuk-Einheiten in den erfindungsgemäßen Verbindungen eingesetzt werden.

Die Nuk-Einheit kann ferner ein in der Natur in Nukleinsäuren vorkommendes Nukleotid sein wie ein Nukleotid mit einer der Basen Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin, Uracil oder Inosin.

Neben natürlich vorkommenden Nukleotiden sind auch solche modifizierten Nukleotide bzw. Nukleotid-Analoga als Nuk-Einheit geeignet, die als Substrat für Nukleotid-akzeptierende Enzyme dienen können. So können als Nuk-Einheit in den erfindungsgemäßen Verbindungen Nukleotid-Analoga eingesetzt werden, deren Base-, Zucker- und/oder Phosphat-Gruppen modifiziert sind. Beispiele für Nukleotid-Modifikationen sind dem Fachmann bekannt (siehe u.a. Shabarova, "Advanced organic chemistry of nucleic acids", ISBN 3-527-29021-4, 1994; Scheit, "Nucleotide Analogs", ISBN 0-471-04854-2, 1980; Kisakürek, "Nucleoside and Nucleic Acid Chemistry", 2000; Mitsuya, "Anti-HIV Nucleosides", 1997; Cheson, "Nucleoside Analogs in cancer therapy", 1997).

Insbesondere kann erfindungsgemäß als Nuk-Einheit ein Nukleotid mit einer modifizierten Base wie z.B. 7-Deazaadenin oder 6-Thioadenin, eingesetzt werden. Ferner können sowohl Ribose als auch 2'-Deoxyribose oder 2',3'-Dideoxyribose das Grundgerüst bzw. die Zuckergruppe der Nuk-Einheiten in den erfindungsgemäßen Verbindung bilden. Auch an der Ribose- bzw. 2'-Desoxyribose -Gruppe modifizierte Nukleotide, wie z.B. an der 3'-Hydroxy-Gruppe modifizierte Nukleotide, können als Nuk-Einheiten in den erfindungsgemäßen Verbindungen eingesetzt werden.

Bei den erfindungsgemäßen Verbindungen ist mindestens eine Nuk-Einheit an einer Kopplungsstelle mit einer Linker-Einheit verbunden. Die Linker-Einheit ist vorzugsweise an

die Base, die Zuckergruppe und/oder die Phosphatgruppen des Nukleotids und/oder des Nukleosids koppelbar.

Wenn die Linker-Einheit an die Base der Nuk-Einheit gekoppelt bzw. gebunden ist, ist sie vorzugsweise an die Positionen 4 und/oder 5 bei Pyrimidin-Basen bzw. an die Positionen 6, 7 und/oder 8 bei Purin-Basen gekoppelt. Mögliche Kopplungsstellen der Linker-Einheit an die Zucker-Gruppe der Nuk-Einheit sind die Positionen 2', 3', 4' und/oder 5'. Die Kopplung der Linker-Einheit an die Phosphatgruppen der Nuk-Einheit kann an der α -, β - und/oder γ -Phosphatgruppe erfolgen.

Beispiele für geeignete Kopplungsstellen an der Base sind in WO 99/49082, WO 02/088382 und WO 03/048387 beschrieben. Beispiele für geeignete Kopplungsstellen an Ribose sind in Herrlein et al., Helvetica Chimica Acta, 1994, 77, 586; Jameson et al., Method in Enzymology 1997, 278, 363; US 5,798,210, US 6,255,475, WO 01/25247 und WO 00/50642 beschrieben. Beispiele für geeignete Kopplungsstellen an Phosphatgruppen sind in Jameson et al., Methods in Enzymology 1997, 278, 363 beschrieben.

Die Position der Kopplungsstelle zwischen Nuk-Einheit und Linker-Einheit hängt vom Einsatzgebiet der erfindungsgemäßen Verbindungen ab. Wenn die Marker-Einheit der erfindungsgemäßen Verbindung nach Einbau einer Nuk-Einheit der erfindungsgemäßen Verbindung in den Nukleinsäurestrang am verlängerten Nukleinsäurestrang verbleiben soll, befindet sich die Kopplungsstelle für die Linker-Einheit vorzugsweise an der Zucker-Gruppe oder an der Base der Nuk-Einheit. Die Kopplung der Linker-Einheit an die β - oder γ -Phosphatgruppen der Nuk-Einheit ist dann bevorzugt, wenn die Markierung beim Einbau einer Nuk-Einheit der erfindungsgemäßen Verbindung in einen Nukleinsäurestrang freigesetzt werden soll.

Erfindungsgemäß kann die Linker-Einheit kovalent oder über zwischenmolekulare Kräfte an das Nukleotid und/oder Nukleosid bzw. die Nuk-Einheit koppelbar sein. Vorzugsweise ist die Bindung zwischen Linker-Einheit und Nuk-Einheit kovalent.

Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Bindung zwischen Nuk-Einheit und Linker-Einheit unter den herkömmlichen Reaktionsbedingungen bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen, z.B. bei Temperaturen bis zu 130°C und/oder in pH-Bereichen von 1 bis 14, beständig und/oder resistent gegen hydrolytische Enzyme wie Proteasen oder Esterasen.

Bei einer alternativen Ausführungsform der Erfindung ist die Bindung zwischen Nuk-Einheit und Linker-Einheit und/oder eine Bindung innerhalb der Linker-Einheit selektiv spaltbar.

Unter einer selektiv spaltbaren Bindung wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Bindung verstanden, die sich von anderen Bindungen der erfindungsgemäßen Verbindung sowie in einer Nukleinsäure vorliegenden Bindungen derart unterscheidet, dass sie unter bestimmten, vorzugsweise milden Bedingungen spezifisch gespalten werden kann, ohne dass die anderen Bindungen, insbesondere die Bindungen des Rückgrats der Nukleinsäure beeinträchtigt werden. Eine derartige selektiv spaltbare Bindung ermöglicht die selektive Entfernung der Linker- und/oder der Marker-Einheiten. Dies kann beispielsweise bei Verfahren der Sequenzierung durch Synthese wie Pyrosequencing, BASS (US 5,798,210; Rasolonjatovo, Nucleosides & Nucleotides 1999, 18, 1021; Metzker et al., Nucl. Acids Res. 1994, 22, 4259; Welch et al., Nucleosides & Nucleotides 1999, 18, 19) oder Einzelmolekülanalyse (WO 02/088382) von Bedeutung sein, bei denen die Markierung nach erfolgtem Einbau und anschließender Detektion der Markierung entfernt werden soll, ohne dass Bindungen des eingebauten Nukleotids und insbesondere Bindungen des Rückgrats der zu sequenzierenden Nukleinsäure beeinträchtigt werden.

Die Wahl der selektiv spaltbaren Bindung ist nicht eingeschränkt, sofern sie unter den Bedingungen der für die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen relevanten enzymatischen Reaktion stabil bleibt, keine irreversible Störung der entsprechenden Enzyme wie z.B. Polymerase verursacht und unter vorzugsweise milden Bedingungen abgespalten werden kann.

Unter milden Bedingungen sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung solche Bedingungen zu verstehen, die insbesondere Nukleinsäure-Primer-Komplexe nicht zerstören, bei denen also z.B. der pH-Wert vorzugsweise zwischen 3 und 11 und die Temperatur vorzugsweise zwischen 0°C und einem Temperaturwert (x) liegt, wobei der Temperaturwert (x) vom Schmelzpunkt T_m des Nukleinsäure-Primer-Komplexes abhängt und beispielsweise als T_m des Nukleinsäure-Primer-Komplexes abzüglich 5°C errechnet werden kann. Beispielsweise liegt die für milde Bedingungen maximale Temperatur bei 42°C, wenn der Schmelzpunkt T_m 47°C ist. Unter derartigen milden Bedingungen eignen sich besonders Ester-, Thioester-, Phosphoester-, Acetal-, Disulfid-Bindungen und photolabile Verbindungen als selektiv spaltbare Bindungen.

Vorzugsweise ist die selektiv spaltbare Bindung eine chemisch spaltbare Bindung, eine enzymatisch spaltbare Bindung und/oder eine photolabile Bindung.

Beispiele für bevorzugte chemisch spaltbare Bindungen sind Ester-, Thioester-, Disulfid- und Acetal-Bindungen (siehe WO 99/49082, S. Wong, "Chemistry of protein conjugation and crosslinking" CRC Press Inc., 1993; Herman et al., Method in Enzymology 1990, 184, 584; Lomant et al., J. Mol. Biol. 1976, 104, 243, S. Patai, "Chemistry of carboxylic acid and esters", Interscience Publ, (1969). Beispiele für photolabile Verbindungen sind u.a. beschrieben in WO 9531429, "Protective groups in organic synthesis", John Wiley & Sons, Inc., 1991; V. Pillai, Synthesis 1980, 1; V. Pillai, Org. Photochem. 1987, 9, 225; H. Giegrich, "Neue photolabile Schutzgruppen für die lichtgesteuerte Oligonucleotidsynthese", Dissertation, Konstanz, 1996; S. M. Bühler, "Neue photolabile Schutzgruppen für die lichtgesteuerte Oligonucleotidsynthese",

Dissertation, Konstanz, 1999). Weitere Beispiele für photochemisch spaltbare Bindungen sind in WO 95/31429 beschrieben.

Beispiele für enzymatisch spaltbare Bindungen sind Peptid- oder Polypeptid-Bindungen, die spaltbar durch Peptidasen sind; sowie Poly- oder Oligosaccharid-Bindungen, die spaltbar durch Disaccharidasen sind, wobei die Spaltung durch ein spezifisches Enzym zwischen bestimmten Monomeren der spaltbaren Stellen stattfinden kann (siehe WO 01/92284).

Die Kopplung einer selektiv spaltbaren Bindung ist beispielsweise beschrieben in WO 02/088382; Metzker et al., Nucleic Acid Research 1994, 22, 4259; Canard et al., Gene 1994, 148, 1; US 6,255,475; WO 01/25247 und WO 0050642. Die selektiv spaltbare Bindung kann ein Teil der Linker-Einheit und/oder die Kopplungsstelle zwischen Linker-Einheit und Nukleotid, und/oder die Bindung zwischen Linker-Einheit und Marker-Einheit und/oder die Bindung zwischen signalvermittelnden Einheiten und detektierbaren Einheiten sein.

Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst eine erfindungsgemäße Verbindung nur eine Nuk-Einheit.

Vorzugsweise umfasst die erfindungsgemäße Verbindung jedoch zwei bis 1.000 Nukleotide und/oder Nukleoside bzw. Nuk-Einheiten, die jeweils über eine Linker-Einheit mit der Marker-Einheit verbunden sind. Die in der erfindungsgemäßen Verbindung vorliegenden Nuk-Einheiten können hinsichtlich ihrer Struktur, insbesondere hinsichtlich ihrer Base, einheitlich oder unterschiedlich sein, wobei beispielsweise durchschnittlich oder exakt 2 bis 5, 3 bis 10, 8 bis 25, 20 bis 50, 40 bis 100, 80 bis 250, 200 bis 500 oder 400 bis 1.000 Nuk-Einheiten in einer erfindungsgemäßen Verbindung vorliegen können.

Wie bereits vorstehend erwähnt, ist die Linker-Einheit der Teil der erfindungsgemäßen Verbindung, der die jeweilige Nuk-Einheit mit der Marker-Einheit verbindet. Dazu weist die

Linker-Einheit an ihren Enden funktionelle Gruppen auf, die die Kopplung mit Nuk-Einheit bzw- Marker-Einheit ermöglichen. Derartige funktionelle Gruppen sind dem Fachmann ohne weiteres bekannt und nachfolgend auch beschrieben.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Linker-Einheit in der erfindungsgemäßen Verbindung 50 bis 10.000 Kettenatome. Weitere bevorzugte Bereiche für die Länge der Linker-Einheit sind 60 bis 100, 80 bis 200, 150 bis 500, 300 bis 1.000, 800 bis 2.000 oder 1.500 bis 5.000 Kettenatome. Die durchschnittliche Kettenlänge, d.h. die größte Länge der Linker-Einheit, die sich unter Wahrung der Valenzwinkel und der Atomabstände bei größtmöglicher Ausdehnung der Linker-Kette ergibt, beträgt von 50 bis 100, 80 bis 200, 150 bis 500, 300 bis 1.000, 500 bis 2.000 oder 1.500 bis 10.000 Angström. Liegen mehrere Nuk-Einheiten und somit auch mehrere Linker-Einheiten in einer erfindungsgemäßen Verbindung vor, gelten die vorgenannten Bereiche für die Länge der Linker-Einheiten auch für die durchschnittliche Länge der Linker-Einheit. Folglich können die Linker-Einheiten erfindungsgemäß eine wesentlich größere Molekülgröße und -masse aufweisen als die jeweilige Nuk-Einheit.

Bevorzugte Kettenatome sind Kohlenstoff, Stickstoff und/oder Sauerstoff. Denkbar sind allerdings auch andere Kettenatome, die üblicherweise als solche in Polymeren vorliegen, wie z.B. Silizium und/oder Schwefel.

Je nach gewünschter Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindung kann die Linker-Einheit rigide und/oder flexible Bereiche enthalten.

Die chemische Struktur der Linker-Einheit ist vorzugsweise ein Polymer, besonders bevorzugt ein hydrophiles Polymer, das aus gleichen oder unterschiedlichen Monomeren aufgebaut ist. Beispiele für geeignete Polymere zum Aufbau der Linker-Einheit sind Polyethylenglykol, Polysaccharide, Dextran, Polyamide, Polypeptide, Polyphosphate,

Polyacetate, Polyalkylenglykole, Copolymere aus Ethylenglykol und Propylenglykol, polyolefinische Alkohole, Polyvinylpyrrolidone, Polyhydroxyalkylmethacrylamide, Polyhydroxyalkylmethacrylate, Poly(x-hydroxysäure), Polyacrylsäure, Polyacrylamid und/oder Polyvinylalkohol.

Das Polymer zum Aufbau der Linker-Einheit kann verzweigt oder nicht verzweigt sein. Ferner ist es denkbar, dass das Polymer aus mehreren unterschiedlich langen Abschnitten besteht, wobei jeder Abschnitt aus gleichen Monomeren besteht und sich die Monomere in unterschiedlichen Abschnitten unterscheiden. Dem Fachmann ist bekannt, dass für eine makromolekulare Linker-Einheit meistens nur eine durchschnittliche Masse bestimmt werden kann, so dass die Angaben zu den Molmassen der Linker-Einheit und somit auch für die erfindungsgemäßen Verbindungen nur einen Mittelwert darstellen können (siehe auch H. Elias, "Makromoleküle; Chemische Struktur und Synthesen", Band 1, 4, ISBN 3-527-29872-X, 1999).

Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die Linker-Einheit auch weitere funktionelle Gruppen enthalten, beispielsweise eine oder mehrere unter milden Bedingungen selektiv spaltbare Bindungen und/oder ein oder mehrere Farbstoffmoleküle.

Die Marker-Einheit ist hinsichtlich ihres chemischen Aufbaus bzw. ihrer chemischen Struktur nicht eingeschränkt, solange die Substrateigenschaften der Nuk-Einheiten für die jeweiligen Enzyme nicht wesentlich beeinträchtigt werden. Vorzugsweise umfasst die Marker-Einheit mindestens eine detektierbare Einheit und/oder mindestens eine signalvermittelnde Einheit, an die eine detektierbare Einheit koppelbar ist. Besonders bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Verbindung 1 bis 1.000 detektierbare Einheiten und/oder signalvermittelnde Einheiten. Weitere bevorzugte Bereiche für die Zahl an detektierbaren bzw. signalgebenden Einheiten und/oder signalvermittelnden Einheiten sind 2 bis 5, 4 bis 20, 10 bis 50, 25 bis 100, 75 bis 500 oder 250 bis 1.000.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Marker-Einheit eine makromolekulare Verbindung. Ein derartiger makromolekularer Marker kann aus einem detektierbaren und/oder signalvermittelnden Makromolekül oder aus einer Gruppe gleicher oder unterschiedlicher strukturellen Untereinheiten mit signalgebender oder signalvermittelnder Funktion, sog. Marker-Untereinheiten, bestehen. Diese detektierbaren oder signalvermittelnden Untereinheiten können Moleküle mit geringer Molekularmasse, wie z.B. unter 2 kDa, oder auch Makromoleküle sein. Eine makromolekulare Marker-Einheit kann 1 oder 2, 2 bis 5, 4 bis 20, 10 bis 50, 25 bis 100, 75 bis 500 oder 250 bis 1.000 signalgebende und/oder signalvermittelnde Einheiten umfassen.

Die makromolekulare Marker-Einheit kann insbesondere eine signalgebende, signalvermittelnde, katalytische und/oder affine, d.h. auf der Ausbildung zwischenmolekulare Wechselwirkungen basierende Funktion haben.

Bei einer signalgebenden Funktion umfasst die makromolekulare Marker-Einheit insbesondere Bestandteile, die bereits während der chemischen Synthese an die erfindungsgemäße Verbindung gebunden werden.

Bei der signalvermittelnden Funktion trägt die Marker-Komponente insbesondere Bestandteile, die erst durch eine Reaktion mit signalgebenden Molekülen bzw. detektierbaren Einheiten ihre Signaleigenschaften entfalten.

Beispielsweise kann die makromolekulare Marker-Einheit mehrere, z.B. 100 Biotin-Moleküle, umfassen. Nach dem Einbau der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgt eine Nachweisreaktion mit modifizierten Streptavidin-Molekülen.

In einer anderen Ausführungsform wird die signalvermittelnde Funktion durch Nukleinsäuren bereitgestellt. Vor oder nach dem Einbau der erfindungsgemäßen Verbindung in eine Nukleinsäure erfolgt beispielsweise eine Hybridisierung von einheitlichen Oligonukleotiden mit detektierbaren Einheiten wie z.B. Fluoreszenzfarbstoffen an eine derartige Marker-Einheit. Falls Nukleinsäuren als makromolekulare Marker eingesetzt werden, so können diese unterschiedliche Abschnitte zur Kopplung anderer Makromoleküle besitzen.

In einer weiteren Ausführungsform wird die die signalvermittelnde Funktion durch eine Vielzahl von Amino- oder Mercapto-Gruppen pro Marker-Einheit bereitgestellt. Vor oder nach dem Einbau der erfindungsgemäßen Verbindung in die Nukleinsäure erfolgt beispielsweise eine chemische Modifikation mit reaktiven Komponenten, z.B. mit Farbstoffen, wie beispielsweise für Allyl-Amino-dUTP beschrieben (siehe Diehl et al., Nucleic Acid Research 2002, 30, Nr. 16, 79).

In einer weiteren Ausführungsform hat die makromolekulare Marker-Komponente eine katalytische Funktion, z.B. in Form eines Enzyms oder Ribozyms. Dabei können unterschiedliche Enzyme verwendet werden, z.B. Peroxidase oder alkalische Phosphatase. Über die Kopplung an die Linker-Einheit und damit an die Nuk-Einheit kann das jeweilige Enzym durch den Einbau der erfindungsgemäßen Verbindung in eine Nukleinsäure (kovalent) an den Nukleinsäurestrang gebunden werden.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die makromolekulare Marker-Einheit eine Affinitätsfunktionalität zu einem anderen Molekül. Beispiele für solche Marker sind Streptavidin-Moleküle oder Nukleinsäuren.

An einen makromolekularen Marker können ferner auch andere Makromoleküle wie z.B. Enzyme gebunden werden.

Ein makromolekularer Marker kann ferner unterschiedliche Detektionseigenschaften aufweisen bzw. unterschiedliche detektierbare Einheiten umfassen. Beispielsweise kann eine makromolekulare Marker-Einheit sowohl mehrere Farbstoffmoleküle als auch Stellen zur affinen Bindung z.B. durch Hybridisierung weiterer Makromoleküle tragen.

In diesem Zusammenhang wird darauf hingewiesen, dass eine Kombination aus Nuk-Einheit, Linker-Einheit mit einer durchschnittlichen Länge von 5 bis 30 Atome und makromolekularem Marker zur Aufhebung der Substrateigenschaften der Nukleotide führt. Alleine die Kombination zwischen einem herkömmlich modifizierten Nukleotid und einem makromolekularen Marker reicht nicht aus, um die Vorteile der erfindungsgemäßen Verbindungen zu gewährleisten. Vielmehr ist hierfür eine Linker-Einheit mit mindestens 50 Kettenatomen zwingend erforderlich.

Bei einer speziellen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die Marker-Untereinheiten eines makromolekularen Markers an ein Grundgerüst gebunden, das im Folgenden auch als Kern-Komponente der Marker-Einheit bezeichnet wird (siehe auch Fig. 3 und 4). Eine derartige Kern-Komponente kann ebenfalls als signalvermittelnde Einheit aufgefasst werden und ist eine Einheit, an die eine Vielzahl von Linker-Einheiten (mit Nuk-Einheiten) und/oder eine Vielzahl von detektierbaren Einheiten und/oder eine Vielzahl weiterer signalvermittelnder Gruppen koppelbar ist.

Vorzugsweise ist die Kern-Komponente wiederum eine makromolekulare Einheit. Diese Kern-Komponente kann mit einer oder mehreren oder sämtlichen der Linker-Einheiten koppelbar sein.

Durch eine Vielzahl an potentiellen Bindungsstellen für detektierbare Einheiten und/oder weitere signalvermittelnde Gruppen an der Kern-Komponente ist die Wahrscheinlichkeit der Bindung von detektierbaren Einheiten an die Kern-Komponente und somit an die jeweilige

Nuk-Einheit im Vergleich zu herkömmlichen modifizierten Nukleotiden wesentlich höher. Dies führt zu einer stark verbesserten Signalintensität.

Ebenso kann durch eine Vielzahl an potentiellen Bindungsstellen für Linker-Einheiten an der Kern-Komponente das Verhältnis von Nuk-Einheiten zu detektierbaren Einheiten im Vergleich zu herkömmlich modifizierten Nukleotiden wesentlich erhöht werden, was zu einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis führt.

Die signalgebenden bzw. detektierbaren oder signalvermittelnden Einheiten bzw. Untereinheiten der Marker-Einheit können aus einer Reihe von Gruppen bzw. Strukturen mit niedriger oder hoher Molmasse ausgewählt werden. Geeignete detektierbare oder signalvermittelnde Einheiten sind dem Fachmann bekannt. Umfasst die erfindungsgemäße Verbindung mehr als eine detektierbare Einheit, so können diese gleiche oder unterschiedliche spektrale Eigenschaften aufweisen.

Unter einer niedermolekularen Marker-Einheit werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung herkömmliche Marker verstanden, die zur Markierung von Nukleotiden verwendet werden, wie beispielsweise ein oder zwei Biotin-Moleküle, ein oder zwei Farbstoff-Moleküle oder ein oder zwei Hapten-Moleküle wie z.B. Digoxigenin.

Detektierbare Einheiten mit niedriger Molmasse sind vorzugsweise ausgewählt aus radioaktiven Isotopen wie P^{32} und/oder I^{131} oder deren Verbindungen, seltenen Erden und/oder Farbstoffen. Die Farbstoffe können gleiche oder unterschiedliche spektrale Eigenschaften aufweisen und sind besonders bevorzugt Fluoreszenzfarbstoffe und/oder Farbstoffe, die untereinander FRET eingehen.

Signalvermittelnde Einheiten mit niedriger Molmasse sind vorzugsweise ausgewählt aus Biotin-Molekülen und/oder Hapten-Molekülen.

Auch chemisch reaktive Gruppen, wie beispielsweise Amino-, Mercapto-, Aldehyd-, Iodacetat-, Acryl-, Dithio- und/oder Thioester-Gruppen können erfindungsgemäß als signalvermittelnde Einheiten dienen. Nach dem Einbau der erfindungsgemäßen Verbindung in eine Nukleinsäure können diese reaktiven Gruppen mit signalgebenden Einheiten, wie beispielsweise Farbstoffen, die entsprechende funktionelle Gruppen aufweisen, wie z.B. NHS-Ester, Mercapto- und/oder Amino-Gruppen, gekoppelt werden. Die Grundlagen für die Wahl eines passenden Paares bestehend aus signalvermittelnder Einheit und signalgebender bzw. detektierbarer Einheit sind dem Fachmann bekannt und u.a. in Shan S. Wong, "Chemistry of protein conjugation and crosslinking", 1993 beschrieben.

Nukleotide oder Nukleoside, die mit einer makromolekularen Linker-Einheit, die mindestens 50 Kettenatome aufweist, und einer Marker-Einheit mit niedriger Molmasse modifiziert sind, sind ebenfalls Gegenstand dieser Erfindung. Sie können sowohl als Zwischenprodukte für die chemische Synthese von erfindungsgemäßen, mit einem makromolekularen Marker gekoppelten Verbindungen als auch selbständig als Bausteine bzw. Substrate in enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden. Beispiel für eine solche Verbindung ist dUTP-PEG-Biotin (siehe Beispiel 19).

Detektierbare und signalvermittelnde Einheiten bzw. Untereinheiten mit großer Molmasse sind vorzugsweise ausgewählt aus Nanokristallen, Proteinen, Nukleinsäuren, Nano- oder Mikroteilchen, und/oder Modifikationen davon.

Die Marker-Einheit kann beispielsweise Nanokristalle in Form von Quantum-Dots umfassen, die gleiche und/oder unterschiedliche spektrale Eigenschaften aufweisen (siehe US 6,322,901; US 6,423,551; US 6,251,303; US 5,990,479).

Beispiele für geeignete Nano- oder Mikro-Teilchen als Marker-Einheit sind Teilchen, deren maximaler Durchmesser von 1 nm bis 2 nm, von 2 nm bis 5 nm, von 4 nm bis 10 nm, von 7 nm bis 20 nm, von 15 nm bis 50 nm, von 25 nm bis 100 nm, von 70 nm bis 200 nm, von 150 nm bis 500 nm, von 250 nm bis 1.000 nm oder von 1.000 nm bis 5.000 nm beträgt. Das Material der Teilchen umfasst beispielsweise reine Metalle wie Gold, Silber, Aluminium, Protein-Gold-Konjugate (J. Anal. Chem. 1998, 70, 5177), Nukleinsäure-Gold-Konjugate (J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 5164; J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 9071; Biochem. Biophys. Res. Commun 2000, 274, 817; Anal. Chem. 2001, 73, 4450), Latex wie z.B. Latex-Nanopartikel (Anal. Chem. 2000, 72, 1979), Kunststoff (Polystyrol), paramagnetische Verbindungen und/oder Gemische (Z.L. Zhi et al., Anal Biochem. 2003, Jul 15;318(2):236-43; D. Dressman et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2003, Jul 22;100(15):8817-22, Metall-Teilchen, magnetische Verbindungen und/oder Gemische davon (K. K. Jain, Expert Rev Mol Diagn. 2003, Mar;3(2):153-61; F. Patolsky et al., Angew Chem Int Ed Engl. 2003, May 30;42(21):2372-2376; X. Zhao et al., Anal Chem. 2003, Jul 15;75(14):3144-51; H. Xu et al., J Biomed Mater Res. 2003, Sep 15;66A(4):870-9; US 2003-092029; WO01/19405).

Beispiele für geeignete Proteinmoleküle als Marker-Einheit sind Enzyme wie z.B. Peroxidase und alkalische Phosphatase, Urease, beta-Galaktosidase, fluoreszierenden Proteine wie z.B. GFP, Antigen-bindende Proteine wie z.B. Antikörper, Tetramere, Affibodies (siehe Nord et. al., Nature Biotechnology , v.15, 772-777) oder deren Bestandteile wie z.B. Fab-Fragmente, und/oder Nukleinsäure-bindende Proteine (z.B. Transkriptionsfaktor).

Beispiele für geeignete Nukleinsäuren als Marker-Einheit sind Oligonukleotide und/oder modifizierte Oligonukleotide, wobei die Nukleinsäuren von 10 bis 20, von 15 bis 50, von 25 bis 100, von 75 bis 200, von 150 bis 500, von 250 bis 1.000, von 750 bis 5.000 oder von 3.000 bis 10.000 Nukleotide umfassen. Es sind DNA-, RNA- und/oder PNA-Moleküle geeignet. Die Nukleinsäuren können ferner zusätzliche Modifikationen tragen, wie

beispielsweise freie Aminogruppen und/oder Farbstoffe. Derartige Modifikationen sind dem Fachmann bekannt.

Weitere Beispiele für Makromoleküle oder Makromolekülkomplexe, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung als detektierbare und/oder signalvermittelnde Einheiten in der Marker-Einheit zur Signalverstärkung eingesetzt werden können, sind in US 4,882,269; US 4,687,732, WO 89/03849 und US 6,017,707 beschrieben.

Die Kern-Komponente, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung ebenfalls als signalvermittelnde Einheit verstanden wird, ist vorzugsweise ausgewählt ist aus wasserlöslichen Polymeren, Nukleinsäuren, Streptavidin, Avidin, Dendrimeren und/oder Derivaten davon und/oder Kombinationen davon.

Das wasserlösliche Polymer kann erfindungsgemäß aus gleichen oder unterschiedlichen Monomer-Einheiten bestehen. Beispiele für geeignete wasserlösliche Polymere bzw. Polymerderivate sind Polyamide wie z.B. Polypeptide, Polyacrylsäure, Polyacrylamide, Polyvinylalkohole und/oder Derivate davon.

Als Kern-Komponente bevorzugte Polypeptide sind insbesondere Poly-Lysin-Moleküle. Poly-Lysin-Moleküle weisen multiple freie Aminogruppen auf, an die Farbstoffmoleküle, Biotin-Moleküle, Hapten-Moleküle, Nukleinsäuren und/oder dergleichen gekoppelt werden können. Poly-Lysine unterschiedlicher Molmasse, z.B. 1.000 bis 2.000, 2.000 bis 10.000 oder 10.000 bis 50.000 Da können beispielsweise von Fluka erworben werden.

Als Kern-Komponente bevorzugte Nukleinsäuren (siehe auch Fig. 5) sind Nukleinsäuren mit einer Länge von 10 bis 20, 15 bis 50, 25 bis 100, 75 bis 200, 150 bis 500, 250 bis 1.000, 750 bis 5.000 oder 2.500 bis 10.000 Nukleotiden.

Als Kern-Komponente bevorzugte Dendrimere sind Polypropylenimin und/oder Polyaminoamin. Beispiele für andere Dendrimere sind dem Fachmann bekannt und beschrieben in Cientifica "Dendrimers", Technology White Papers Nr. 6, 2003; Klajnert et al., Acta Biochimica Polonica, 2001,48, 199; Manduchi et al., Physiol. Genomics 2002, 10, 169; Sharma et al., Electrophoresis 2003, 24, 2733; Morgan et al., Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 2002, 5(6), 966; Benders et al., Nucleic Acids Res. 2002, 15, 30(2), E10; und Nilsen et al., J. Theor. Biol. 1997, 21, 187(2), 273. Geeignete Dendrimere sind beispielsweise von Genisphere (Hatfield, Pennsylvania, USA) oder Chimera Biotech GmbH kommerziell erhältlich.

Die Kern-Komponente kann selbstverständlich auch aus Kombinationen der vorgenannten Substanzen gebildet werden. Die Bildung derartiger Kombinationen ist dem Fachmann bekannt.

Die Art der Kopplung zwischen den jeweiligen Einheiten bzw. Komponenten hängt insbesondere von deren jeweiliger chemischer Struktur ab. Geeignete Kopplungsarten sind dem Fachmann bekannt und nachfolgend beschrieben. So sind Beispiele für die Kopplung von Nukleinsäuren, z.B. als detektierbare oder signalvermittelnde Einheit, an Dendrimere, z.B. als Kern-Komponente, in Shchepinov et al., Nucleic Acids Res. 1999, 1, 27(15), 3035; oder Goh et al., Chem. Commun. (Camb). 2002, 21, (24), 2954 dargestellt.

Vorzugsweise ist die detektierbare Einheit an die Linker-Einheit kovalent oder über zwischenmolekulare Wechselwirkungen koppelbar. Ebenso ist es bevorzugt, dass die signalvermittelnde Einheit und/oder die Kern-Komponente kovalent oder über zwischenmolekulare Wechselwirkungen an die Linker-Einheit koppelbar sind. Des Weiteren ist es bevorzugt, dass die detektierbare Einheit kovalent oder über zwischenmolekulare Wechselwirkungen an die signalvermittelnde Einheit koppelbar ist.

Beispiele für geeignete kovalente Bindungen sind Cross-Linker (siehe S. Wang, Chemistry of protein conjugation and cross-linking, ISBN 0-8493-5886-8, 1993; M. Aslam, "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", ISBN 0-333-58375-2, 1996). Beispiele für Bindungen über zwischenmolekulare Kräfte bzw. affine Kopplungen sind Biotin-Streptavidin-Bindungen, Hybridisierungen von Nukleinsäuren und/oder Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen (M. Aslam, siehe oben).

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Nukleotid bzw. Nukleosid an die Linker-Einheit bzw. die Linker-Einheit an die Marker-Einheit bzw. eine signalvermittelnde Einheit an eine detektierbare Einheit über eine chemische Einheit koppelbar, die ausgewählt ist aus $R_6\text{-NH-R}_7$, $R_6\text{-O-R}_7$, $R_6\text{-S-R}_7$, $R_6\text{-SS-R}_7$, $R_6\text{-CO-NH-R}_7$, $R_6\text{-NH-CO-R}_7$, $R_6\text{-CO-O-R}_7$, $R_6\text{-O-CO-R}_7$, $R_6\text{-CO-S-R}_7$, $R_6\text{-S-CO-R}_7$, $R_6\text{-P(O)}_2\text{-R}_7$, $R_6\text{-Si-R}_7$, $R_6\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-R}_7$, $R_6\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-R}_7$, $R_6\text{-A-(CH}_2\text{)}_n\text{-R}_7$, $R_6\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-B-R}_7$, $R_6\text{-(CH=CH)}_n\text{-R}_7$, $R_6\text{-(A-CH=CH)}_n\text{-R}_7$, $R_6\text{-(CH=CH-B)}_n\text{-R}_7$, $R_6\text{-A-CH=CH-(CH}_2\text{)}_n\text{-R}_7$, $R_6\text{-(-CH=CH-CH}_2\text{)}_n\text{-B-R}_7$, $R_6\text{-(C}\equiv\text{C)}_n\text{-R}_7$, $R_6\text{-(A-C}\equiv\text{C)}_n\text{-R}_7$, $R_6\text{-(C}\equiv\text{C-B)}_n\text{-R}_7$, $R_6\text{-A-C}\equiv\text{C-(CH}_2\text{)}_n\text{-R}_7$, $R_6\text{-(-C}\equiv\text{C-CH}_2\text{)}_n\text{-B-R}_7$,

wobei

R_6 das Nukleotid und/oder Nukleosid bzw. die Nuk-Einheit ist;

R_7 die Linker-Einheit ist, und

A und B folgende chemische Einheiten umfassen: -NH- , -O- , -S- , -SS- , -CO-NH- , -NH-CO- , -CO-O- , -O-CO- , -CO-S- , -S-CO- , $\text{-P(O)}_2\text{-}$, -Si- und/oder $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$, wobei n - gleich 1 bis 5 ist.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Kopplung zwischen Linker-Einheit und detektierbarer Einheit und/oder zwischen Linker-Einheit und signalvermittelnder Einheit bzw. Kern-Komponente unter den herkömmlichen Reaktionsbedingungen für die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen, z.B. bei Temperaturen bis zu 130°C und/oder in pH-Bereichen von 1 bis 14, beständig und/oder resistent gegen hydrolytische Enzyme wie Proteasen oder Esterasen.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Kopplung zwischen Linker-Einheit und detektierbarer Einheit und/oder zwischen Linker-Einheit und signalvermittelnder Einheit bzw. Kern-Komponente selektiv spaltbar. Ebenso kann es bevorzugt sein, dass die Bindung zwischen signalvermittelnder und detektierbarer Einheit selektiv spaltbar ist, vorzugsweise jeweils unter milden Bedingungen. Als selektiv spaltbare Bindungen sind insbesondere solche geeignet, die bereits vorstehend im Zusammenhang mit der Bindung zwischen Nuk-Einheit und Linker-Einheit beschrieben wurden

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Nuk-Einheit bzw. das Nukleotid oder Nukleosid und/oder die Linker-Einheit und/oder die Marker-Einheit sterisch anspruchsvoll, so dass nach Einbau der erfindungsgemäßen Verbindung in eine Nukleinsäure, z.B. DNA oder RNA, der Einbau weiterer Nukleotide inhibiert ist, siehe auch WO 02/088382.

In einer speziellen Ausführungsform hat die erfindungsgemäße Verbindung eine Nuk-Einheit mit der in Fig. 6A dargestellten Strukturformel, wobei die Substituenten die folgenden Bedeutungen aufweisen:

Base: Adenin, 7-Deazaadenin, Guanin, 7-Deazaguanin, Thymin, Cytosin, Uracil, und/oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähige Modifikationen;

L: Linker-Einheit;

X: Kopplungsstelle des Linkers an die Base;

R₁: H;

R₂: H, OH, Halogen, NH₂, SH und/oder eine mit herkömmlichen Schutzgruppen versehene OH-Gruppe;

R₃: H, OH, Halogen, PO₃, SH, NH₂, O- R₃₋₁, P- R₆, NH-R₆, S-R₆ und/oder Si-R₆, wobei R₆ eine chemisch, photochemisch oder enzymatisch spaltbare Gruppe ist;

R₄: H und/oder OH; und

R₅: OH, eine mit herkömmlichen Schutzgruppen versehene OH-Gruppe, Monophosphat, Diphosphat und/oder Triphosphat.

Wie bereits vorstehend erwähnt, kann eine erfindungsgemäße Verbindung bis zu 1.000 Nuk-Einheiten umfassen.

In einer weiteren speziellen Ausführungsform hat die erfindungsgemäße Verbindung eine Nuk-Einheit mit der in Fig. 6B dargestellten Strukturformel, wobei die Substituenten die folgenden Bedeutungen aufweisen:

Base: Adenin, 7-Deazaadenin, Guanin, 7-Deazaguanin, Thymin, Cytosin, Uracil und/oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähige Modifikationen;

R₁: H;

R₂: H, OH, Hal, NH₂, SH und/oder eine geschützte OH-Gruppe;

R₃: O- R₆, P(O)_m- R₆, wobei m 1 oder 2 ist, NH-R₆, S-R₆ und/oder Si-R₆, wobei R₆ die Bindung des Linkers (L) an das Nukleotid ist;

R₄: H oder OH;

R₅: OH, eine geschützte OH-Gruppe, eine Monophosphat-Gruppe, eine Diphosphat-Gruppe und/oder eine Triphosphat-Gruppe.

In einer weiteren speziellen Ausführungsform hat die erfindungsgemäße Verbindung eine Nuk-Einheit mit der in Fig. 6B dargestellten Strukturformel, wobei die Substituenten die folgenden Bedeutungen aufweisen:

Base: Adenin, 7-Deazaadenin, Guanin, 7-Deazaguanin, Thymin, Cytosin, Uracil und/oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähige Modifikationen;

R₁: H;

R₂: H, OH, Hal, NH₂, SH und/oder geschützte OH-Gruppe;

R_3 : H, OH, Hal, PO_3 , SH, NH_2 und/oder O- R_6 , $P(O)_m$ - R_6 , $NH-R_6$, $S-R_6$ und/oder $Si-R_6$ wobei R_6 eine chemisch, photochemisch oder enzymatisch spaltbare Gruppe ist und m 1 oder 2 ist;

R_4 : H und/oder OH;

R_5 : O- R_7 -L, $P-(O)_3$ - R_7 -L (modifizierte Monophosphat-Gruppe), $P-(O)_3$ - $P-(O)_3$ - R_7 -L (modifizierte Diphosphat-Gruppe), und/oder $P-(O)_3$ - $P-(O)_3$ - $P-(O)_3$ - R_7 -L (modifizierte Triphosphat-Gruppe), wobei R_7 die Bindung des Linkers (L) an die Nuk-Einheit ist.

Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weisen bei einer Population von erfindungsgemäßen Verbindungen sämtliche Verbindungen dieselbe Anzahl an Nukleotiden und/oder Nukleosiden bzw. Nuk-Einheiten auf. Beispielsweise können pro Streptavidin-Molekül maximal vier Biotin-Moleküle gebunden werden, so dass bei sättigender Konzentration von Nuk- und Linker-Einheiten eine einheitliche Population an erfindungsgemäßen Verbindungen entsteht.

Die Zahl an Nuk-Einheiten kann allerdings in einer Population von erfindungsgemäßen Verbindungen auch von Verbindung zu Verbindung variieren und muss nicht notwendigerweise für jede einzelne erfindungsgemäße Verbindung konstant sein.

Bei einer weiteren Ausführungsform weist eine Population von erfindungsgemäßen Verbindungen eine definierte durchschnittliche Zahl an Nukleotiden und/oder Nukleosiden bzw. Nuk-Einheiten pro Verbindung auf, in der Population selbst findet allerdings eine Verteilung der tatsächlichen Besetzung der erfindungsgemäßen Verbindung mit Nuk-Einheiten statt. Die Konzentrationsangaben von Nuk-Einheiten stellen in dieser Ausführungsform einen Mittelwert dar. Solche Nuk-Makromoleküle können insbesondere dann eingesetzt werden, wenn die Nuk-Einheit eine terminierende Eigenschaft aufweist.

Wie ebenfalls bereits oben erwähnt, kann eine erfindungsgemäße Verbindung bis zu 1.000 Marker-Einheiten umfassen, siehe oben.

Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weisen bei einer Population von erfindungsgemäßen Verbindungen sämtliche Verbindungen dieselbe Anzahl an Marker-Einheiten auf. Beispielsweise können pro Streptavidin-Molekül maximal 4 Biotin-Moleküle gebunden werden, so dass bei sättigender Konzentration von Linker- und Marker-Einheiten eine einheitliche Population an erfindungsgemäßen Verbindungen entsteht.

Die Zahl an Marker-Einheiten kann allerdings in einer Population von erfindungsgemäßen Verbindungen auch von Verbindung zu Verbindung variieren und muss nicht notwendigerweise für jede einzelne erfindungsgemäße Verbindung konstant sein.

Bei einer weiteren Ausführungsform weist eine Population von erfindungsgemäßen Verbindungen eine definierte durchschnittliche Zahl an Marker-Einheiten pro Verbindung auf, in der Population selbst findet allerdings eine Verteilung der tatsächlichen Besetzung der erfindungsgemäßen Verbindung mit Marker-Einheiten statt. Bei sättigender Konzentration an Marker-Einheiten bei der Synthese findet eine zunehmend einheitlichere Besetzung der erfindungsgemäßen Verbindungen mit Marker-Einheiten statt. Derartige Verbindungen bzw. Populationen sind beispielsweise für Verfahren von Bedeutung, bei denen Schwankungen in der Signalintensität innerhalb einer Population zu vernachlässigen sind. So spielt beispielsweise in Anwendungsbereichen, bei denen es lediglich um einen qualitativen Nachweis geht, die exakte Zahl der Marker-Einheiten pro erfindungsgemäße Verbindung eine untergeordnete Rolle. In solchen Fällen ist das Vorhandensein eines stabilen Signals an sich von Bedeutung. Beispiele für solche Verfahren stellen Sequenzierungs-Verfahren mit einzelnen Molekülen dar.

Im Folgenden sind einige wesentliche Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung zusammengefasst:

Die erfindungsgemäßen Verbindungen umfassen in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Nuk-Einheit mit einer über eine Kopplungsstelle gekoppelten Linker-Einheit und einer Marker-Einheit, wobei die Linker-Einheit von 50 bis 100, 75 bis 200, 180 bis 500, 300 bis 1.000, 700 bis 2.000 oder 1.500 bis 5.000 Kettenatome umfasst.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen die erfindungsgemäßen Verbindungen eine Nuk-Einheit mit einer über eine Kopplungsstelle gekoppelten Linker-Einheit und einer Marker-Einheit, wobei die Linker-Einheit von 50 bis 100, 75 bis 200, 180 bis 500, 300 bis 1.000, 700 bis 2.000 oder 1.500 bis 5.000 Kettenatome umfasst und die Kopplung zwischen Nuk-Einheit und Linker-Einheit bzw. Bindungen innerhalb der Linker-Einheit selektiv spaltbar sind.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen die erfindungsgemäßen Verbindungen eine Nuk-Einheit mit einer über eine Kopplungsstelle gekoppelten Linker-Einheit und einer Marker-Einheit, wobei die Linker-Einheit von 50 bis 100, 75 bis 200, 180 bis 500, 300 bis 1.000, 700 bis 2.000 oder 1.500 bis 5.000 Kettenatome umfasst und ein oder mehrere Einheiten der erfindungsgemäßen Verbindung derart modifiziert sind, dass nur ein Nukleotid bzw. Nukleosid in einen wachsenden Nukleinsäurestrang eingebaut werden kann.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen die erfindungsgemäßen Verbindungen mehrere Nuk-Einheiten, gekoppelt jeweils über eine Linker-Einheit an eine Marker-Einheit, wobei die jeweilige Linker-Einheit von 50 bis 100, 75 bis 200, 180 bis 500, 300 bis 1.000, 700 bis 2.000 oder 1.500 bis 5.000 Kettenatome umfasst.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen die erfindungsgemäßen Verbindungen mehrere Nuk-Einheiten, gekoppelt jeweils über eine Linker-Einheit an eine Marker-Einheit, wobei die jeweilige Linker-Einheit von 50 bis 100, 75 bis 200, 180 bis 500, 300 bis 1.000, 700 bis 2.000 oder 1.500 bis 5.000 Kettenatome umfasst und die Kopplung zwischen Nuk-Einheiten und Linker-Einheiten bzw. Bindungen innerhalb der Linker-Einheiten selektiv spaltbar sind.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen die erfindungsgemäßen Verbindungen mehrere Nuk-Einheiten, gekoppelt jeweils über eine Linker-Einheit an eine Marker-Einheit, wobei die jeweilige Linker-Einheit unabhängig von der Länge der anderen Linker-Einheiten in der selben erfindungsgemäßen Verbindung von 50 bis 100, 75 bis 200, 180 bis 500, 300 bis 1.000, 700 bis 2.000 oder 1.500 bis 5.000 Kettenatome umfasst und ein oder mehrere Einheiten der erfindungsgemäßen Verbindung derart modifiziert sind, dass nur ein Nukleotid bzw. Nukleosid in einen wachsenden Nukleinsäurestrang eingebaut werden kann.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Umsetzung mindestens eines Nukleotids oder Nukleosids mit mindestens einer Linker-Einheit, die mindestens 50 Kettenatome umfasst, wobei die Kopplung der Linker-Einheit an die Base, den Zuckerring und/oder die Phosphatgruppen des Nukleotids oder Nukleosids erfolgt; und

- (b) Umsetzung der Verbindung aus Schritt (a) mit mindestens einer detektierbaren Einheit und/oder mindestens einer signalvermittelnden Einheit, an die eine detektierbare Einheit koppelbar ist.

Vorzugsweise erfolgt Schritt (b) erst nach Einbau der Verbindung aus Schritt (a) in eine Nukleinsäure, z.B. DNA oder RNA. Alternativ kann Schritt b) bereits vor Einbau der erfindungsgemäßen Verbindung in einen wachsenden Nukleinsäurestrang erfolgen

Alternativ umfasst das erfindungsgemäße Verfahren die folgenden Schritte:

- (a) Umsetzung mindestens einer Linker-Einheit mit mindestens einer detektierbaren Einheit und/oder mindestens einer signalvermittelnden Einheit, an die eine detektierbare Einheit koppelbar ist; und
- (b) Umsetzung der Verbindung aus Schritt (a) mit mindestens einem Nukleotid oder Nukleosid, wobei die Kopplung der Linker-Einheit an die Base, den Zuckerring und/oder die Phosphatgruppen des Nukleotids oder Nukleosids erfolgt.

Die Kopplung zwischen Nukleotid und/oder Nukleosid und/oder Linker-Einheit und/oder detektierbarer Einheit und/oder signalvermittelnder Einheit erfolgt bei den vorstehend beschriebenen Verfahren vorzugsweise kovalent oder über zwischenmolekulare Wechselwirkungen. Für Beispiele für kovalente Bindungen und zwischenmolekularen Wechselwirkungen wird auf die obigen diesbezüglichen Ausführungen verwiesen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können somit auf unterschiedliche Art und Weise synthetisiert werden. Die Reihenfolge der Kopplungsschritte kann variieren. Beispielsweise kann zunächst eine Linker-Einheit an die Nuk-Einheit gekoppelt und anschließend die

Marker-Einheit gekoppelt werden. Andererseits können ein oder mehrere Linker-Einheiten an die Marker-Einheit und erst anschließend die Nuk-Einheiten gekoppelt werden.

Die Kopplung zwischen einzelnen Komponenten der Nuk-Makromoleküle kann z.B. kovalent oder affin, d.h. über zwischenmolekulare Wechselwirkungen erfolgen, wobei z.B. sowohl chemische als auch enzymatische Kopplungen zur Verknüpfung einzelner Komponenten eingesetzt werden kann (siehe oben). Kopplungen an Amino- und Thiolgruppen dienen als Beispiele für kovalente Kopplungen (D. Jameson et al., *Methods in Enzymology* 1997, 278, 363; S. Patai, "The chemistry of the amino group", 1968; S. Patai, "The chemistry of the thiol group", 1974). Biotin-Streptavidin-Bindungen oder Hybridisierungen zwischen komplementären Nukleinsäuresträngen oder Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen stellen Beispiele für affine Kopplungen dar.

Die Kopplung zwischen Nuk-Einheiten und Linker-Einheiten erfolgt vorzugsweise kovalent. Beispiele für eine kovalente Kopplung an Nukleotide oder deren Analoga sind dem Fachmann bekannt (siehe Jameson et al., *Method in Enzymology* 1997, 278, 363; Held et al., *Nucleic acid research* 2002, 30, 3857; US 6,579,704; WO 01/92284). Dabei kann die Kopplung beispielsweise an Phosphat, Amino-, Hydroxy- oder Mercaptogruppen erfolgen.

Die Kopplung zwischen Linker-Einheit und Marker-Einheit kann beispielsweise zwischen reaktiven Gruppen der Linker-Einheit und der Marker-Einheit erfolgen. Reagenzien für solche Kopplungen sind in S. Wang, "Chemistry of protein conjugation and cross-linking", 1993, ausführlich dargestellt. Die Verfahren zur Handhabung und zur Kopplung von mehreren Makromolekülen sind für unterschiedliche Typen von Makromolekülen auch in der hierin genannten Patentliteratur dargestellt. Weitere Beispiele für Kopplungen an die und zwischen Makromolekülen sind für Proteine in M. Aslam, "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", ISBN 0-333-58375-2, 1996; D. Clonis, "Reactive dyes in protein an enzyme technology", ISBN 0-333-34500-2, 1987; G. Likhtenshtein, "Biophysical

labeling methods in molecular biology", ISBN 0-521-43132-8, 1993; R. Lundblad, "Techniques in protein modification", 1995; R. Lundblad, "Chemical reagents for protein modification", ISBN 0-8493-2606-0, 1991; für Nukleinsäuren in J. Sambrook, "Molecular Cloning", Band 1-3, ISBN 0-87969-576-5, 2001; und für andere Polymerarten in H. Elias, "Makromoleküle, Chemische Struktur und Synthesen", Band 1, 4, ISBN 3-527-29872-X, 1999 beschrieben.

Da die Marker-Einheit bei bestimmten Ausführungsformen eine Vielzahl von Kopplungsstellen für Linker-Einheiten und/oder signalgebende und/oder signalvermittelnde Einheiten aufweisen kann, können weitere Modifikationen an den erfindungsgemäßen Verbindungen vorgenommen werden. Beispielsweise können überschüssige Amino-Gruppen abgeblockt werden oder durch weiterführende Modifikationen verändert werden.

Je nach Einsatzgebiet und Reaktionsbedingungen, unter denen die erfindungsgemäßen Verbindungen verwendet werden, können unterschiedliche chemische Bindungsarten zwischen einzelnen Teilen der Makromoleküle von Vorteil sein. So eignen sich beispielsweise für Verfahren bei höheren Temperaturen, wie z.B. Hybridisierungen oder PCR, erfindungsgemäße Verbindungen, die kovalente, thermostabile Bindungen zwischen einzelnen Einheiten haben.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen in unterschiedlichen Anwendungen in Biotechnologie, Medizin und Wissenschaft.

Nukleotide spielen z.B. eine zentrale Rolle in unterschiedlichen Stoffwechselvorgängen, beispielsweise bei der Speicherung und Übertragung der genetischen Information in der Zelle (B. Lewin, "Genes", 1994). Auch sind Nukleotide als Energieträger der Zelle (ATP, UTP) oder Signalvermittler (Messenger, GTP) der intrazellulären Signalvermittlung bekannt (G.

Löffler, "Biochemie und Pathobiochemie", 2003). Aus diesem Grund werden Nukleotide und ihre Analoga als Therapeutika und Diagnostika eingesetzt. Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft somit die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen als Therapeutika oder Diagnostika durch Kopplung entsprechender Wirkstoffe bzw. Marker über die makromolekulare Linker-Einheit.

Ferner bietet die Kopplung einer makromolekularen Marker-Einheit an eine Nukleotid- oder Nukleosid-Einheit, die wiederum als Substrat für diverse Enzyme dient, unter Beibehaltung der Substrateigenschaften der Nukleotide vielfältige Möglichkeiten für die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen, z.B. für eine gezielte Adressierung der modifizierten Nukleotiden innerhalb eines Organismus oder einer Zelle, so dass die erfindungsgemäßen Verbindungen ein neues Modell für Nukleotid-Prodrugs darstellen.

Somit können die erfindungsgemäßen Verbindungen insbesondere in Verfahren eingesetzt werden, bei denen die Nukleotid- oder Nukleosid-Einheiten als Substrate für Enzyme dienen. Die Nuk-Einheit der erfindungsgemäßen Verbindung kann als Substrat für unterschiedliche Enzyme dienen.

Als Enzyme können beispielsweise unterschiedliche Formen von Polymerasen verwendet werden (Kornberg, "DNA Replication", 2. Ed. 1992), insbesondere DNA-abhängige DNA-Polymerasen, RNA-abhängige DNA-Polymerasen, DNA-abhängige RNA-Polymerasen und RNA-abhängige RNA-Polymerasen. Dabei können sowohl thermostabile als auch thermolabile Polymerasen verwendet werden, wie beispielsweise Klenow-Polymerase oder Taq-Polymerase. Andere Beispiele für mögliche Polymerasen findet ein Fachmann in der hier zitierten Literatur. Ein weiteres Beispiel für Enzyme sind Transferasen wie Terminale Deoxynucleotidyltransferase.

Beispielsweise dient die Nuk-Einheit, in dieser Ausführungsform als Nukleosid-Triphosphat, als Substrat für eine Polymerase, so dass die Nuk-Einheit durch eine Polymerase in einen wachsenden Nukleinsäurestrang eingebaut werden kann und somit die gesamte erfindungsgemäße Verbindung an den Strang kovalent gekoppelt wird.

Auch andere Enzyme und Proteine wie beispielsweise Kinasen, Phosphorylasen, Transferasen oder Membranrezeptoren, die Nukleotide als Substrate, als Energiequelle, als Cofaktoren oder als Messenger-Substanzen akzeptieren, können im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

Enzyme unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, modifizierte Nukleotide als Substrate zu akzeptieren. Im folgenden werden nur DNA-Polymerasen als Beispiel angegeben. Dem Fachmann ist bekannt, dass verschiedene funktionelle Tests eingesetzt werden müssen, um bestimmte Eigenschaften von Nukleotiden zu untersuchen und anzuwenden. Beispiele für unterschiedliche Testabläufe für die Markierung von Nukleinsäuren sind in H. Held et al., Nucleic Acid Research 2002, 30, 3857; M. Metzger et al., Nucleic Acid Research 1994, 22, 4259; M. Herrlein et al., Helvetica Chimica Acta 1994, 77, 586; B. Canard et al., PNAS 1995, 92, 10859; US 5,798,210; J. Hovinen et al., J. Chem. Soc. Perkin 1994, 211 sowie in anderen hier zitierten Patenten und Publikationen angegeben.

Bei der Wahl der Polymerase spielt die Art der verwendeten immobilisierten Nukleinsäure, d.h. RNA oder DNA, eine entscheidende Rolle. Die passenden Kombinationen zwischen Polymerasen und modifizierten Nukleotiden können für den jeweiligen Zweck entsprechend gewählt werden.

Falls RNA, z.B. mRNA, als Substrat in einer Sequenzierungsreaktion eingesetzt wird, können handelsübliche RNA-abhängige DNA-Polymerasen eingesetzt werden, z.B. AMV-Reverse Transkriptase (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), M-MLV Reverse Transkriptase (Sigma) oder

HIV-Reverse Transkriptase ohne RNase-Aktivität. Für bestimmte Anwendungen können Reverse Transkriptasen von RNase-Aktivität weitgehend frei sein, z.B. bei der mRNA-Markierung für Hybridisierungsexperimente.

Falls DNA, z.B. cDNA, als Substrat verwendet wird, eignen sich als Polymerasen prinzipiell alle DNA-abhängigen DNA-Polymerasen mit oder ohne 3'-5' Exonuklease-Aktivität (DNA-Replication", Ed. A. Kornberg, Freeman and company, New York, USA, 1992), z.B. modifizierte T7-Polymerase vom Typ "Sequenase Version 2" (Amersham Pharmacia Biotech), Klenow Fragmente der DNA-Polymerase I mit oder ohne 3'-5' Exonukleaseaktivität (Amersham Pharmacia Biotech), Polymerase Beta verschiedenen Ursprungs (M. Fry, "Animal Cell DNA Polymerases", CRC Press Inc., 1983; kommerziell erhältlich bei Chimerx), thermostabile Polymerasen wie beispielsweise Taq-Polymerase (GibcoBRL), proHA-DNA-Polymerase (Eurogentec), Vent, Vent exo -, Pfu und dergleichen. Auch DNA-abhängige RNA-Polymerasen können verwendet werden, wie z.B. E.coli RNA-Polymerase, T7-RNA-Polymerase, SP6 RNA Polymerase. Im Folgenden werden DNA-abhängige DNA-Polymerasen als Beispiele für alle Polymerasen angesehen.

Die Substrateigenschaften des bzw. der Nuk-Einheit(en) bestimmt/bestimmen die Substrateigenschaften der Nuk-Makromoleküle. So kann die Nuk-Einheit als ein Terminator dienen, so dass nur eine einzige erfindungsgemäße Verbindung eingebaut werden kann. In einer anderen Ausführungsform dient die Nuk-Einheit als reversibler Terminator, der die Durchführung einer schrittweise kontrollierten Verlängerungsreaktion erlaubt, wie z.B. in WO 02/088382 beschrieben.

So betrifft die vorliegende Erfindung in einer Ausführungsform die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zum Einbau in Nukleinsäuren wie DNA oder RNA, und besonders bevorzugt zur Markierung von Nukleinsäuren.

Die Einbaureaktion der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgt üblicherweise nach den allgemeinen Regeln für enzymatische Verlängerungsreaktionen von Nukleinsäuren (siehe u.a. Maniatis, "Molecular Cloning", 3. Auflage, 2001).

Durch die vorstehend ausführlich beschriebene Möglichkeit der Inkorporierung einer Vielzahl von detektierbaren Einheiten pro eingebauter Nukleotid-Einheit in die erfindungsgemäße Verbindung, insbesondere unter Verwendung einer makromolekularen Marker-Einheit, wird eine wesentlich höhere Signalstärke im Vergleich zu herkömmlich modifizierten Nukleotiden erzielt. Ferner kann durch die ebenfalls vorstehend ausführlich beschriebene Inkorporierung einer Vielzahl von, auch gleichartigen, Nukleotiden in einer erfindungsgemäßen Verbindung das Verhältnis der Konzentration von Nukleotiden zu detektierbaren Einheiten erhöht werden. Beispielsweise ist ein Aufbau der erfindungsgemäßen Verbindung denkbar, der etwa 500 Nukleotide und etwa 100 detektierbare Einheiten pro Verbindung umfasst. Auf diese Weise kann das Signal-Rausch-Verhältnis wesentlich verbessert werden und gleichzeitig eine Signalverstärkung herbeigeführt werden.

Erfolgt die Markierung einer Nukleinsäure beispielsweise während der enzymatischen Synthese durch den Einbau von erfindungsgemäßen Verbindungen, so sind keine weiteren mehrstufigen Signalamplifikationsschritte erforderlich. Dadurch werden die Nachteile der mit nur mäßigen und schwankenden Ausbeuten ablaufenden Signalamplifikationsschritte wie z.B. Signalamplifikationen bei FISH-Analysen vermieden, die schwankende und schwache Signale und Schwäche verursachen und so zu Fehlinterpretationen führen. Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen werden die Signalstärken deutlich verbessert und auch Signalschwankungen weitgehend ausgeglichen.

Die Markierung von Nukleinsäuren kann in unterschiedlichen Verfahren eingesetzt werden. Die konkreten Bedingungen der Nukleinsäurevorbereitung sowie die Reihenfolge der

enzymatischen Schritte und Detektionsvorgänge hängen im Einzelnen von dem jeweiligen Verfahren ab, bei dem die Markierung eingesetzt wird.

Vorzugsweise erfolgt der Einbau der erfindungsgemäßen Verbindungen in Flüssigphase oder an der Festphase.

In einer Ausführungsform der Markierungsverfahren befinden sich die zu markierenden Nukleinsäureketten in der Flüssigphase. Beispielsweise kann auch eine PCR mit erfindungsgemäßen Verbindungen durchgeführt werden. Die auf diese Weise markierten Nukleinsäuren können beispielsweise als Sonden für die Hybridisierung an andere Nukleinsäuren eingesetzt werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Markierungsverfahren befinden sich die zu markierenden Nukleinsäuren an einer festen Phase. Beispiele für die feste Phase sind Mikrokügelchen, z.B. Streptavidin-polystyrene Particle, 2,17 μ (Spherotech Inc.) und an einer Oberfläche gebundene Nukleinsäuren. Die feste Phase kann ferner beispielsweise eine plane Oberfläche sein oder in Form von Kügelchen bzw. Beads oder Multigefäßarrays wie z.B. Microtiterplatten oder Nanotiterplatten vorliegen. Dabei können Nukleinsäuren mit verschiedenen Methoden an die feste Phase gekoppelt werden (siehe US 5,412,087; US 5,610,287; US 5,482,867; US 5,981,734; M. Schena, "Microarray biochip technology", Eaton Publishing, 2000; M. Schena, "DNA Microarrays", Oxford University Press, 1999; Allemand et al., Biophysical Journal 1997, 73, 2064; Trabesinger et al., Analytical Chemistry 1999, 71, 279; Osborne et al., Analytical Chemistry 2000, 72, 3678; Timofeev et al., Nucleic Acid Research 1996, 24, 3142; Ghosh et al., Nucleic Acid Research 1987, 15, 5353; Gingeras et al., Nucleic Acid Research 1987, 15, 5373; Maskos et al., Nucleic Acid Research 1992, 20, 1679). Vorzugsweise sind die zu analysierenden Nukleinsäuren mit einem Primer versehen (Maniatis 2001, siehe oben).

Insbesondere eignen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen für den Einbau in die an eine festen Phase gekoppelten Nukleinsäuren zur Durchführung von Analysenverfahren wie beispielsweise Minisequencing (A. Suomalainen et al., Methods Mol Biol. 2003;226:361-6; U. Liljedahl et al., Pharmacogenetics. 2003 Jan;13(1):7-17; C. Olsson et al., Methods Mol Biol. 2003;212:167-76), Primer-Extension (M. C. Pirrung et al., Bioorg Med Chem Lett. 2001, Sep 17;11(18):2437-40; H. Cai et al., Genomics. 2000 Jun 1;66(2):135-43; A. Kurg et al., Genet Test. 2000;4(1):1-7; T. Pastinen et al., Genome Res. 1997 Jun; 7(6):606-14); US 6,287,766, US 2003-148284, US 2003-082613, EP 1256632, WO0194639), Sequenzierung durch die Synthese (SBS) (US 5,547,839, US 5,798,210; Rasolonjatovo, Nucleosides & Nucleotides 1999, v.18 S.1021, Metzker et al. NAR 1994, v.22, S.4259, Welch et al. Nucleosides & Nucleotides 1999, v.18, S.197), Single-Molecular-Sequencing (WO 02/088382, WO 00/18956, WO 02/072892,).

Bei einer bevorzugten Ausführungsform sind erfindungsgemäße Verbindungen, deren Nukleobasen des jeweils in die Nukleinsäure eingebauten Nukleotids identisch sind, mit identischen detektierbaren Einheiten versehen bzw. über signalvermittelnde Einheiten mit identischen detektierbaren Einheiten versehen. Besonders bevorzugt ist die detektierbare Einheit für die jeweilige Nukleobase spezifisch.

D.h., erfindungsgemäße Verbindungen mit einer Nuk-Einheit einer Art, beispielsweise dT, tragen vorzugsweise eine für sie spezifische Marker-Einheit, so dass beispielsweise vier Arten der erfindungsgemäßen Verbindungen, entsprechend den Basen dT, dC, dA und dG, gleichzeitig eingesetzt und unterschieden werden können. Andere Markierungsschemata sind bekannt (siehe WO 02/088382). Je nach Anwendung werden auch nicht markierte, natürlich vorkommende Nukleotide in das Reaktionsgemisch zusammen mit den erfindungsgemäßen Verbindungen zugegeben.

Bei einer weiteren Ausführungsform erfolgt der Einbau an mehreren, hinsichtlich ihrer Nukleinsäuresequenz jeweils einheitlichen Populationen von an einer festen Phase fixierten Nukleinsäuremolekülen, wobei jede Population eine adressierbare Position auf der festen Phase aufweist. Vorzugsweise unterscheiden sich mindestens zwei der Populationen von Nukleinsäuremolekülen in ihrer Nukleinsäuresequenz.

Alternativ erfolgt der Einbau an zufällig an einer festen Phase fixierten Nukleinsäuremolekülen. Die Einbaureaktion erfolgt beispielsweise gleichzeitig an einer Population unterschiedlicher, an einer festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei diese Nukleinsäuremoleküle in einer zufälligen Anordnung an die feste Phase gebunden sind (siehe WO 02/088382). Die an der enzymatischen Reaktion teilnehmenden Primer-Nukleinsäurekomplexe sind in einer Dichte fixiert, die den Einbau der erfindungsgemäßen Verbindungen an einem einzelnen Nukleinsäure-Molekül ermöglichen, wobei die Dichte der fixierten Primer oder Nukleinsäuren wesentlich höher liegen kann. Beispielsweise beträgt die Dichte der an der Einbaureaktion teilnehmenden Primer-Nukleinsäurekomplexe von einem Komplex auf $10\ \mu\text{m}^2$ bis zu einem Komplex auf $100\ \mu\text{m}^2$, von einem Komplex auf $100\ \mu\text{m}^2$ bis zu einem Komplex auf $1.000\ \mu\text{m}^2$ oder von einem Komplex auf $1.000\ \mu\text{m}^2$ bis einem Komplex auf $10.000\ \mu\text{m}^2$. Die Zahl der parallel zu analysierenden einzelnen Nukleinsäuremoleküle liegt beispielsweise von 1.000 und 100.000, 10.000 bis 1.000.000 oder 100.000 bis 10.000.000 Moleküle.

Beispiele für die Fixierung von Nukleinsäuren an eine feste Phase mit einer Auflösung, die Analysen an einzelnen Molekülen erlaubt, sind in WO 01/57248, US 2003-064398, US 2003-013101 und WO 02/088382 dargestellt. Eine geeignete Detektionsapparatur ist z.B. in der Anmeldung WO 03/031947 beschrieben.

Ferner kann es bevorzugt sein, dass die Markierung nach Einbau der Verbindung in eine Nukleinsäure an dem verlängerten Nukleinsäurestrang verbleibt und nicht abgetrennt wird. So

erfolgt beispielsweise die Einbaureaktion der erfindungsgemäßen Verbindungen an einer einzigen Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei die Marker-Einheit nach dem Einbau am verlängerten Primer verbleibt und nicht abgetrennt wird.

In einer weiteren Ausführungsform erfolgt der Einbau der erfindungsgemäßen Verbindungen in einer enzymatischen Reaktion parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen einheitlicher, an einer festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei diese Populationen adressierbare Positionen auf der festen Phase aufweisen, wobei die Marker-Einheit nach dem Einbau am verlängerten Primer verbleibt und nicht abgetrennt wird. Die adressierbaren Positionen können beispielsweise im Falle einer planen Oberfläche die Form von Spots haben. Bei der Verwendung von Kügelchen als feste Phase werden unterschiedliche Populationen von Nukleinsäuren an unterschiedlichen Kügelchen fixiert. Bei der Verwendung von Multigefäßarrays sind einzelne Nukleinsäurepopulationen in einzelnen Gefäßen getrennt fixiert.

Alternativ wird die Markierung durch den Einbau der erfindungsgemäßen Verbindungen in einen wachsenden Nukleinsäurestrang von dem Nukleotid oder Nukleosid abgetrennt. So erfolgt beispielsweise die Einbaureaktion der erfindungsgemäßen Verbindungen an einer einzigen Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei die Marker-Einheit oder ihre Untereinheiten mit oder ohne Linker-Einheit während der Einbaureaktion oder nach der Einbaureaktion von der Nuk-Einheit abgetrennt wird.

Die Einbaureaktion erfolgt beispielsweise gleichzeitig an einer Population unterschiedlicher, an einer festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei diese Nukleinsäuremoleküle in einer zufälligen Anordnung an die feste Phase gebunden sind und wobei die Marker-Einheit oder ihre Untereinheiten mit oder ohne Linker-Einheit während der Einbaureaktion oder nach der Einbaureaktion von der Nuk-Einheit abgetrennt wird. Die an der enzymatischen Reaktion

teilnehmenden Primer-Nukleinsäurekomplexe sind vorzugsweise in einer Dichte fixiert, die den Einbau der erfindungsgemäßen Verbindungen an einem einzelnen Nukleinsäure-Molekül ermöglichen, wobei die Dichte der fixierten Primer oder Nukleinsäuren wesentlich höher liegen kann. Beispielsweise beträgt die Dichte der an der Einbaureaktion teilnehmenden Primer-Nukleinsäurekomplexe von einem Komplex auf $10\ \mu\text{m}^2$ bis zu einem Komplex auf $100\ \mu\text{m}^2$, von einem Komplex auf $100\ \mu\text{m}^2$ bis zu einem Komplex auf $1.000\ \mu\text{m}^2$ oder von einem Komplex auf $1.000\ \mu\text{m}^2$ bis einem Komplex auf $10.000\ \mu\text{m}^2$. Die Zahl der parallel zu analysierenden einzelnen Nukleinsäuremoleküle liegt beispielsweise von 1.000 und 100.000, 10.000 bis 1.000.000 oder 100.000 bis 10.000.000 Moleküle.

Beispiele für die Fixierung von Nukleinsäuren an eine feste Phase mit einer Auflösung, die Analysen an einzelnen Molekülen erlaubt, sind in WO 01/57248, US 2003-064398, US 2003-013101 und WO 02/088382 dargestellt. Eine geeignete Detektionsapparatur ist z.B. in WO 03/031947 beschrieben.

In einer Ausführungsform erfolgt der Einbau der erfindungsgemäßen Verbindungen in einer enzymatischen Reaktion parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei diese Populationen adressierbare Positionen an der festen Phase haben und die Marker-Einheit oder ihre Untereinheiten mit oder ohne Linker-Einheit während der Einbaureaktion oder nach der Einbaureaktion von der Nuk-Einheit abgetrennt wird. Die adressierbaren Positionen können beispielsweise im Falle einer planen Oberfläche die Form von Spots haben. Bei der Verwendung von Kügelchen als feste Phase werden unterschiedliche Populationen von Nukleinsäuren an unterschiedlichen Kügelchen fixiert. Bei der Verwendung von Multigefäßarrays sind einzelne Nukleinsäurepopulationen in einzelnen Gefäßen getrennt fixiert.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, insbesondere bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindung bei Markierungsverfahren, werden erfindungsgemäße

Verbindungen eingesetzt, die den Einbau nur einer einzelnen Nuk-Einheit in den wachsenden Nukleinsäurestrang erlauben, wobei der mehrfache Einbau durch Modifikationen an der Nuk-Einheit und/oder der Linker-Einheit und/oder der Marker-Einheit verhindert wird. Der weitere Einbau kann sowohl reversibel als auch irreversibel verhindert werden. Im Falle eines reversiblen Stops kann er in einem weiteren Verfahrensschritt aufgehoben werden, so dass weitere Einbaureaktionen stattfinden können. Beispiele für eine reversible Blockade der Einbaureaktion sind dem Fachmann bekannt (siehe Metzker et al., Nucleic acid Research 1994, 22, 4259; Canard et al., Gene 1994, 148, 1; US 6,255,475; WO 01/25247; WO 00/50642; WO 02/088382).

In einer alternativen Ausführungsform können weitere Nukleotide nach dem Einbau der erfindungsgemäßen Verbindungen eingebaut werden, so dass auch mehrere erfindungsgemäße Verbindungen in einen komplementären Strang nacheinander eingebaut werden können.

Nachfolgend sollen beispielhaft einige Möglichkeiten zur Synthese von Erfindungsgemäßen Verbindungen dargestellt werden. Diese dienen nicht zur Einschränkung der möglichen Synthesewege und nicht zur Einschränkung der möglichen Strukturen für erfindungsgemäße Verbindungen.

In den folgenden Beispielen werden erfindungsgemäße Verbindungen mit Polyethylenglycol (PEG) als Linker-Einheit beschrieben. Beispiele für die Kopplungen von PEG an andere Moleküle sind in Milton Harris "Poly(ethylene glycol) : chemistry and biological applications", 1997 beschrieben. Im einzelnen können sehr unterschiedliche reaktive Gruppen zur Kopplung eingesetzt werden: N-Succinimidylcarbonate (US 5,281,698; US 5,468,478), Amine (Buckmann et al., Makromol. Chem. 182, 1379 (1981); Zalipsky et al., Eur. Polym. J. 19, 1177 (1983)); Succinimidylpropionate und Succinimidylbutanoate (Olson et al. in Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, 170-181, Harris & Zalipsky Eds.,

ACS, Washington, D.C., 1997; US 5,672,662), Succinimidylsuccinate (Abuchowski et al., Cancer Biochem. Biophys., 7, 175 (1984); Joppich et al., Makromol. Chem., 1, 80, 1381 (1979)), Benzotriazolcarbonate (US 5,650,234), Glycidylether (Pitha et al., Eur. J. Biochem., 94, 11 (1979), Elling et al., Biotech. Appl. Biochem., 13, 354 (1991)), Oxycarbonylimidazole (Beauchamp, et al., Anal. Biochem., 131, 25 (1983), Tondelli et al., J. Controlled Release, 1, 251 (1985)), p-Nitrophenylcarbonate (Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., 11, 141 (1985); und Sartore et al., Appl. Biochem. Biotech., 27, 45 (1991)), Aldehyde (Harris et al., J. Polym. Sci. Chem. Ed., 22, 341 (1984); US 5,824,784, US 5,252,714), Maleimide (Goodson et al., Bio/Technology, 8, 343 (1990), Romani et al. in Chemistry of Peptides and Proteins, 2, 29 (1984), und Kogan, Synthetic Comm., 22, 2417 (1992)), Orthopyridyldisulfide (Woghiren, et al., Bioconj. Chem., 4, 314 (1993)), Acrylol (Sawhney et al., Macromolecules, 26, 581 (1993)), Vinylsulfone (US 5,900,461). Weitere Beispiele für Kopplungen von PEG an andere Moleküle sind in Roberts et al., Adv. Drug Deliv. Reviews, 54, 459 (2002), US 2003-124086, US 2003-143185, WO 03/037385, US 6,541,543, US 2003-158333 und WO 01/26692 zu finden.

Andere ähnliche Polymere können in ähnlicher Art gekoppelt werden. Beispiele für solche Polymere sind andere Polyalkylenglykole, Copolymere aus Ethylenglykol und Propylenglykol, polyolefinische Alkohole, Polyvinylpyrrolidone, Polyhydroxyalkylmethacrylamide, Polyhydroxyalkylmethacrylate, Polysaccharide, Poly(x-hydroxy-Säuren), Polyacrylsäure und/oder Polyvinylalkohol.

In einer Ausführungsform kann die Linker-Einheit beispielsweise in mehreren Verfahrensschritten aufgebaut werden.

Beispielsweise wird im ersten Schritt ein kurzer Linker mit einer reaktiven Gruppe an das Nukleotid angekoppelt, z.B. ein Propargylamin-Linker an Pyrimidin (siehe auch US 5,047,519). Andere kurze Linker, die zur Kopplung der restlichen Linker-Einheit an die Nuk-

Einheit geeignet sind, sind z.B. in US 4,828,979, US 6,211,158, US 4,804,748, EP 0286028, M. Hanna, Method in Enzymology 1996 v.274, S.403; Zhu et al., NAR 1994, v.22 3418; Jameson et al., Method in Enzymology, 1997, v. 278, 363; Held et al., Nucleic acid research, 2002, v. 30, 3857-; US 6,579,704, WO 01/92284, Herrlein et al., Helvetica Chimica Acta 1994, V. 77, 586; US 5,798,210, US 6,255,475, WO 01/25247, WO 00/50642 beschrieben. Einige Verbindungen sind kommerziell erhältlich, z.B. bei Trilink Biotechnologies, Eurogentec oder Jena Bioscience.

Im zweiten Schritt kann die Kopplung des Nukleotides mit einem kurzen Linker an das Polymer erfolgen. Polymere mit reaktiven funktionellen Gruppen sind z.B. bei Fluka kommerziell erhältlich.

Nach der Kopplung des Nukleotids an das Polymer kann in dieser Ausführungsform in einem letzten Schritt die Marker-Komponente gekoppelt werden.

Die Aufreinigung der Nuk-Einheiten der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgt mit konventionellen Mitteln der Nukleotidchemie: beispielsweise mit Kieselgel-Chromatographie in einem Wasser-Ethanol-Gemisch, Ionenaustausch-Chromatographie in einem Salz-Gradienten und Reverse-Phase-Chromatographie in einem Wasser-Methanol-Gradienten. Für Nukleotide optimierte Chromatographie-Säulen werden von Sigma-Aldrich angeboten. Die Aufreinigung von makromolekularen Linker-Einheiten und Marker-Einheiten kann durch Ultrafiltration, Gel-Elektrophorese, Gelfiltration und Dialyse erfolgen, siehe M. Aslam, "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", 1996.

Die Molmasse der erfindungsgemäßen Verbindungen unterscheidet sich wesentlich von der Masse einzelner Nukleotide. Aus diesem Grund ist es vorteilhaft, bei den Endreinigungsschritten die Ultrafiltration einzusetzen. Da für die erfindungsgemäßen Verbindungen nur

eine durchschnittliche Masse berechnet wird, eignet sich Ultrafiltration auch als analytische Methode zu Trennung von Syntheseprodukten.

Zur Charakterisierung der erfindungsgemäßen Verbindungen können unterschiedliche Methoden der makromolekularen Chemie angewendet werden, z.B. Massenspektroskopie, Fraktionierung, Größenausschlußchromatographie, Ultrazentrifugation (H. Elias, 1999, M. Aslam, 1996, siehe oben).

Ausführungsbeispiele

Die erfindungsgemäßen Verbindungen werden in den Beispielen als Nuk-Makromoleküle bezeichnet.

Trennungsmethoden:

Dünnschichtchromatographie, DC:

Analytisch: „DC-Alufolien 20 x 20 cm Kieselgel 60 F 254“ (VWR), beschichtet mit Fluoreszenzindikator. VISualisierung erfolgt mittels UV-Licht. Laufmittel Ethanol-Wasser-Gemisch (70:30) (Laufmittel, LM 1) oder Ethanol-Wasser-Gemisch (90:10) (LM 2).

Präparativ: Kieselgel-Glasplatten mit Sammelschicht (VWR). LM 1 oder LM 2.

Umkehrphasen-Chromatographie (RP-Chromatographie), RP-18:

C-18 Material (Fluka), Säulenvolumen 10 ml, Wasser-Methanol-Gradient. Fraktionen je 1 ml wurden gesammelt und mit UV-VIS-Spektrometer analysiert. Fraktionen mit ähnlichen Spektren wurden vereinigt und lyophilisiert.

HPLC-Säulen mit ähnlichem Material können verwendet werden (Sigma).

Ionenaustausch-Chromatographie

DEAE-Zellulose (VWR), Gradient NH_4HCO_3 20 mmol/l – 1 mol/l, Fraktionen wurden unter UV/VIS -Kontrolle gesammelt und auf Grundlage gleicher Spektren vereinigt.

Die Affinitätsisolierung von Nuk-Makromolekülen kann beispielsweise eingesetzt werden, wenn Oligonukleotide Bestandteil der Marker-Komponente sind. Durch die Hybridisierung an eine komplementäre, auf einer festen Phase fixierte Nukleinsäure können sie selektiv isoliert werden.

Die Bestimmung der Ausbeuten für farbstoffmarkierte Produkte erfolgte an UV-VIS-Spektrometern.

Die Vollständigkeit der Kopplung an Streptavidin wurde durch eine Kontrolltitration mit einem Biotin-Farbstoff (Biotin-4-Fluoreszein, Sigma) 100 µmol/l in 50 mmol/l Borat, pH 8,5 min bei RT durchgeführt. Bei einer kompletten Besetzung von Biotin-Bindungsstellen an Streptavidin während der Synthese erfolgt keine Markierung von Streptavidin. Bei einer nicht ausreichenden Reaktion erfolgt eine Bindung an SA. Analyse mit UV-VIS.

Material:

Diamono PEG 10.000 (Diamino-Polyethylenglycol 10.000, Sigma), dUTP-AA (dUTP-Allylamine, Jena-Bioscience), TTP (Thymidin-Triphosphat, kann auch als dTTP gekennzeichnet werden, Sigma), 3'-Amino-TTP (3'-Amino-3'-deoxy-Thymidin-Triphosphat, Trilink), PDTP (3-(2-Pyridinyl-dithio)-propionsäure), PDTP-NHS (3-(2-Pyridinyl-dithio)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidyl-ester, Sigma), Cy3 (Farbstoff, Amersham Bioscience), Cy3-NHS (Cy3-N-hydroxysuccinimidyl-ester, Amersham Bioscience), MEA (Mercaptoethylamine, Sigma), CA (Cystamine, Sigma), TCEP - (Tris-(2-carboxyethyl)phosphine, Sigma), DTBP (3,3'-Dithio-Bis-Propionsäure, Fluka), Biotin-NHS (Biotin-N-hydroxysuccinimidyl-ester, Sigma), J-Ac (Iodoacetat, Sigma), TEAE (Tris-(2-Aminoethyl)amine, Sigma), Maleimido-ES-NHS (Maleimido-Essigsäure-N-hydroxysuccinimidyl-ester, Sigma), EDA (Ethyldiamin, Sigma), CDI (1,1'-Carbonyldiimidazol, Sigma), NHS-PEG-Maleimid, 3.400 Da, Biotin-PEG-NHS, 5.000 Da (Nektar Molecular engineering), 3'-Biotin-dT31 (ein Oligonukleotid mit einer Sequenz aus 31 Thymidinmonophosphaten, mit einem Biotin-Molekül am 3'-Ende; MWG-Biotech, Deutschland), 3'-SH-Oligo-dT30 (ein Oligonucleotid mit einer Sequenz aus 30 Thymidinmonophosphaten, mit einer Merkaptogruppe am 3'-Ende; MWG-Biotech, Deutschland), SA (Streptavidin, Roche), SA-Cy2 (mit Cy2-Farbstoff modifiziertes Streptavidin, Amersham), QDot (Qdot 605 Streptavidin Conjugat, Quantum Dot), Poly-Lysin

1000 - 2000 (Poly-L-lysin-hydrobromid 1000 -2000 Da, Fluka), Poly-Lysin 10.000 - 20.000 (Poly-L-lysin-hydrobromid 10.000 -20.000 Da, Fluka).

Lösungsmittel wurden, wenn nötig, absolutiert verwendet (Fluka) oder nach Standardverfahren getrocknet. Bei Lösungsmittelgemischen beziehen sich die angegebenen Mischungsverhältnisse auf die eingesetzten Volumina (v/v).

Synthese einzelner Komponenten:

Beispiel 1:

dUTP-AA-PDTP, Fig 7A

20 mg dUTP-AA wurden in 1 ml Wasser gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf 8,5 eingestellt. Zur dUTP-AA - Lösung wurde PDTP-NHS 60 mg in 0,5 ml Methanol, tropfenweise unter Rühren zugegeben. Reaktion wurde 2 h bei 40°C durchgeführt. DC-Kontrolle: dUTP-AA-PDTP (in LM 1 Rf 0,45).

Die Trennung von überschüssigem PDTP-NHS und PDTP erfolgte auf präparativen Kieselgel-Platten, LM 2. Das Produkt, dUTP-AA-PDTP, und dUTP-AA bleiben auf der Startlinie. Die Nukleotide wurden von der Platte mit Wasser eluiert und eingengt. Dieses dUTP-Analog trägt nun eine Disulfid-Bindung, die in einer Thiolaustauschreaktion mit anderen Thiolen reagieren kann und eine unter milden Bedingungen spaltbare Verbindung darstellt.

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 7-Deaza-Aminopropargyl-Guanosin-Triphosphat und 7-Deaza-Aminopropargyl-Adenosin-triphosphat

können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 8 bis 11.

Beispiel 2:

dCTP-PA-PDTP, Fig. 7B

Die Synthese wurde ähnlich wie für dUTP-AA-PDTP (siehe Beispiel 1) durchgeführt.

Beispiel 3:

dUTP-AA-Propionat-SH, Fig. 12

Zu 200 µl 40 mmol/l Lösung von dUTP-AA-PDTP wurde 1 ml TCEP-Lösung 250 mmol/l, pH 8, eingestellt mit NaOH, zugegeben und 10 min bei RT gerührt.

Die Trennung der Nukleotide von anderen Reagenzien erfolgte auf präparativen Kieselgel-Platten, LM 2. Produkt, dUTP-AA-Propionat-SH und dUTP-AA, bleiben auf der Startlinie.

Die Nukleotide wurden von der Platte mit Wasser eluiert und eingengt.

Dieses dUTP-Analog trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

Beispiel 4:

Biotin-PEG-Ethyl-SH, Fig. 13

Zu 200 µl wässriger CA-Lösung (100 mmol/l), pH 8,5, eingestellt mit NaOH, wurden 10 mg Biotin-PEG-NHS zugegeben und bei 40°C 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde 200 µl TCEP-Lösung (0,5 mol/l), pH 8,0, zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt. Das Produkt wurde durch Ultrafiltration auf 3.000 MWCO (Molecular weight cut off) von anderen Reagenzien getrennt. Ausbeute 35%.

Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

Beispiel 5:

Bis-Dithio-(Ethyl-PEG-Biotin)

Zu 1 ml wässriger CA-Lösung (2 mmol/l), pH 8,5 mit NaOH eingestellt, wurden 100 mg Biotin-PEG-NHS zugegeben und bei RT 18 Stunden gerührt. Das Produkt wurde durch Ultrafiltration auf 10.000 MWCO von anderen Reagenzien getrennt und lyophilisiert. Ausbeute 13%.

Das Produkt besitzt eine Disulfid-Verbindung, die an Thiolaustauschreaktionen teilnehmen kann.

Beispiel 6:

MEA-Cy3, Fig. 14

Zu 1 ml wässriger CA-Lösung, 200 mmol/l, pH 8,5 eingestellt mit NaOH, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 10 mmol/l betrug. Die Reaktion wurde 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurde 1 ml TCEP-Lösung (0,5 mol/l), pH 8,0 eingestellt mit NaOH, zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt. Das Produkt wurde auf RP-18 getrennt (Wasser-Methanol-Gradient) und auf 0,5 ml eingengt, Ausbeute 93%, UV-VIS.

Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

Beispiel 7:

Cy3-TEAE, Fig. 15

Zu 1 ml wässriger TEAE-Lösung, 300 mmol/l, pH 8,5 mit NaOH eingestellt, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 5 mmol/l betrug. Die Reaktion wurde 10 min bei RT gerührt. Das Produkt wurde auf RP-18 getrennt und auf 0,5 ml eingengt, Ausbeute 82%, UV-VIS.

Das Produkt hat zwei Aminogruppen, die leicht mit anderen Reagentien modifiziert werden können und neue Funktionalitäten an den Farbstoff koppeln können.

Beispiel 8:

Cy3-TEAE-Propionat-SH, Fig. 16

Zu 300 µl wässriger Cy3-TEAE, 2 mmol/l, pH 7.5, wurden langsam 30 µl einer frisch bereiteten methanolischen Lösung von PDTP-NHS, 30 mmol/l, zugegeben. Der Ablauf der Reaktion wurde durch DC, LM 1, kontrolliert. Als Reaktionsprodukte erscheinen auf DC Substanzen (LM 1) mit Rf. 0,55 (Cy3-TEAE-PDTP) und 0,95 (Cy3-TEAE-(PDTP)₂). Nach Ablauf von 1 h wurde die Reaktion gestoppt und die Produkte auf DC mit LM 1 getrennt. Die Substanz mit Rf. 0,55 wurde isoliert, eingengt und in 200 µl Wasser aufgelöst. Zu dieser Lösung wurde 0,1 ml TCEP-Lösung (0,5 mol/l), pH 8,0, zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt. Das Produkt, Cy3-TEAE-Propionat-SH, wurde auf RP-18 getrennt (Wasser-Methanol-Gradient) und auf 0,5 ml eingengt, Ausbeute 26%, UV-VIS.

Das Produkt trägt einerseits eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung, andererseits eine Amino-Gruppe, die mit anderen Reagentien reagieren kann.

Beispiel 9:

TEAE-(Cy3)₂, Fig. 17

Zu 1 ml wässriger TEAE-Lösung, 2 mmol/l, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 4 mmol/l betrug. Die Reaktion wurde 10 min bei RT gerührt. Das Produkt (Rf. 0,45) wurde auf präparat. Kieselgel DC mit LM 1 von anderen Reaktionsprodukten getrennt, mit 50 mM Borat-Puffer, pH 9, eluiert, danach auf RP-18 gesammelt und anschließend mit 50% Et-OH eluiert und auf 0,5 ml eingengt, Ausbeute 22%, UV-VIS.

Das Produkt trägt zwei Farbstoffmoleküle. Diese Verbindung ist größer als MEA-Cy3 und photostabiler. Sie trägt eine freie Aminogruppe, die leicht modifiziert werden kann.

Beispiel 10:

Poly-Lysin-(Cy3)_n, n = 10-15, Poly-Lysin 10.000-20.000, Fig. 18

Zu 1 ml wässriger Poly-Lysin-Lösung, 1 mmol/l, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 18 mmol/l betrug. Die Reaktion wurde 40 min bei RT gerührt. Die Trennung von modifiziertem Poly-lysin von Farbstoffresten erfolgte durch Ultrafiltration, 3000 MWCO. Bestimmung der durchschnittlichen Zahl Cy3-Moleküle erfolgte über UV-VIS-Spektrometer.

Poly-Lysin stellt ein Beispiel für eine Kern-Komponente dar, an die mehrere Marker-Einheiten, beispielsweise Farbstoffe gekoppelt werden können. In diesem Experiment wurde die Verteilung von Cy3-Molekülen in Poly-Lysin-Population rechnerisch ermittelt, aus den bekannten Größenunterschieden der Poly-Lysin-Moleküle und der mittleren ermittelten Zahl von Cy3-Molekülen.

Beispiel 11:

TEAE-(Cy3)₂-PDTP und TEAE-(Cy3)₂-Propionat-SH, Fig. 19

Zu 200 µl TEAE-(Cy3)₂, 1 mmol/l wurden 10 mg, PDTP-NHS zugegeben und 1 Stunde bei RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde durch DC, LM 1, kontrolliert. Nach 1 h wurde eine fast quantitative Umsetzung von TEAE-(Cy3)₂ (Rf. 0,45) zu TEAE-(Cy3)₂-PDTP, (Rf. 0,85) festgestellt. Der Ansatz wurde in zwei gleiche Teile geteilt.

Das Produkt, TEAE-(Cy3)₂-PDTP, aus dem ersten Teil wurde auf RP-18 getrennt und lyophilisiert. Ausbeute 82%, UV-VIS.

Das Produkt trägt eine Disulfidbindung, die leicht an einer Thiolaustauschreaktion teilnehmen kann und somit an andere Verbindungen gekoppelt werden kann.

Zum zweiten Teil wurde 0,1 ml TCEP-Lösung (0,5 mol/l), pH 8,0, zum Ansatz zugegeben und noch 10 min bei RT gerührt. Das Produkt, TEAE-(Cy3)₂-Propionat-SH, wurde auf RP-18 getrennt, Ausbeute 68%, UV-VIS.

Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

Beispiel 12

(HS-Propionat)m-Poly-Lysin-(Cy3)_n, (n = 10-15, m 3-9, Poly-Lysin 10.000-20.000), Fig. 20

Zu 200 µl Poly-Lysin-(Cy3)_n, 1 mmol/l wurden 10mg, PDTP-NHS zugegeben und 1 Stunde bei RT gerührt. Das Produkt, (PDTP)m-Poly-Lysin-(Cy3)_n, wurde durch Ultrafiltration von den PDTP-Resten abgetrennt und anschließend in 100 µl Wasser gelöst. Danach wurde 0,1 ml TCEP-Lösung (0,5 mol/l), pH 8,0, zum Ansatz zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt.

Das Produkt, (HS-Propionat)_m-Poly-Lysin-(Cy3)_n, wurde mit 3.000 MWCO von den niedermolekularen Bestandteilen getrennt.

Das Produkt trägt mehrere reaktive SH-Gruppen, die leicht modifiziert werden können, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

Beispiel 13:

TTP-3'-O-Propionat-SH, Fig. 21A

Die Synthese von 3'-modifizierten Nukleotiden erfolgt nach Gottikh et al. Tetrahedron, 1970, v. 26, 4419, Schäfer et al. Method in Enzymology, 1986, v. 126, 682.

DTBP, 210 mg, wurden in 1 ml DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurde CDI 320 mg zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 10 µl Methanol zugegeben und nach weiteren 10 min wurden 100 µl dieser Lösung, 1 mol/l, zu 300 µl wässriger 100 mmol/l-Lösung von TTP, pH 8,5 eingestellt mit NaOH, zugegeben und ca. 4 h bei RT kräftig gerührt. Die Nukleotide wurden durch Präzipitation mit Ethanol isoliert und dann in 300 µl Wasser gelöst. Anschließend wurde 200 µl TCEP-Lösung (0,5 mol/l), pH 8,0, zugegeben und nach 10 min bei RT erfolgt die wiederholte Präzipitation der Nukleotide. Die Trennung der modifizierten Nukleotide von den nicht modifizierten ist auf dieser Stufe nicht notwendig. Ausbeute 13%, UV-VIS.

Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

Beispiel 14:

TTP-3'-Amino-PDTP, Fig. 21B

Die Synthese erfolgte wie für dUTP-AA, Beispiel 1, beschrieben: Als Edukte wurden 3'-Amino-3'-Deoxy-TTP, 100 µl, 10 mmol/l Lösung, pH 8 und PDTP-NHS eingesetzt. Ausbeute 19%, UV-VIS.

Das Produkt trägt eine Disulfidbindung, die leicht an einer Thiolaustauschreaktion teilnehmen kann und somit an andere Verbindungen gekoppelt werden kann.

Auch andere, am 3'-Ende mit einer Bindungsstelle, z.B. einem kurzen Linker, modifizierte Nukleotide können eingesetzt werden. Synthesen sind dargestellt beispielsweise in Metzker et al., Nucleic acid Research 1994, V.22, S. 4259, Canard et al. Gene, 1994, V. 148, 1, Hovinen et al., J. Chem. Soc. Perk. Trans. 1994V.1, S. 211, Herrlein et al., Helvetica Chimica Acta, 1994, V. 77, S. 586, Jameson et al., Method in Enzymology, 1997, V. 278, 363, US 5,798,210, US 6,255,475, WO 01/25247, Parce WO 00/50642.

Weitere Beispiele für basenmodifizierte Nukleotide, die als Nuk-Einheit verwendet werden können, sind in WO 03/048387 beschrieben. Noch weitere Beispiele für Nukleotid-Analoga sind in "Nucleotide Analogs" Scheit, 1980, ISBN 0-471-04854-2, "Nucleoside and Nucleic Acid Chemistry", Kisakürek 2000, "Anti-HIV Nucleosides" Mitsuya, 1997, "Nucleoside Analogs in cancer therapy", Cheson, 1997 angegeben. Dem Fachmann ist klar, dass auch andere Nukleoside und Nukleotide verwendet werden können.

Beispiele für Kopplung von Linker-Komponenten und Marker-Komponenten an Nukleotid-Einheiten

Beispiel 15:

dUTP-AA-SS-MEA-Cy3, Fig. 22

Zu 100 µl, 10 mmol/l MEA-Cy3 in 50 mM Borat, pH 9,5, wurde 50 µl 30 mmol/l dUTP-AA-PDTP in 50 mM Borat, pH 9,5 zugegeben. Nach 1 Stunde wurde das dUTP-AA-SS-MEA-Cy3 durch Dünnschicht-Chromatographie, LM 1, Rf. 0.6, von MEA-Cy3, Rf. 0,9, getrennt. Anschließend wurde dUTP-AA-SS-MEA-Cy3 auf RP-18 von dUTP-AA-PDTP getrennt. Ausbeute 67%, UV-VIS.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und eine niedermolekulare Marker-Funktionalität trägt.

Das Produkt ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid: die Linker-Länge ist kleiner als 30 Atome, die Marker-Komponente ist niedermolekular. Es kann stellvertretend für konventionell modifizierte Nukleotide mit nur einem niedermolekularen Marker auftreten.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase) als Substrat akzeptiert, s. Beispiel 34A.

Beispiel 16:

dUTP-AA-SS-TEAE-(Cy3)₂, Fig. 23

dUTP-AA-SS-TEAE-(Cy3)₂ wurde ähnlich wie dUTP-AA-SS-MEA-(Cy3), Beispiel 15, synthetisiert, dabei wurde TEAE-(Cy3)₂-Propionat-SH anstatt von MEA-Cy3 verwendet. Ausbeuten 43%, UV-VIS.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und zwei niedermolekulare Marker-Funktionalitäten trägt.

Das Produkt ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid: die Linker-Länge ist kleiner als 30 Atome, die Marker-Komponente ist niedermolekular. Es kann stellvertretend für konventionell modifizierte Nukleotide mit mehreren niedermolekularen Markern auftreten.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation des Nukleotids führt zum Verlust der Substrateigenschaften.

Beispiel 17:

dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3, Fig. 24

dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3 wurde ähnlich wie dUTP-AA-SS-MEA-Cy3, Beispiel 15, synthetisiert, dabei wurde Cy3-TEAE-Propionat-SH anstatt von MEA-Cy3 verwendet. Ausbeute 37%, UV-VIS.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und eine niedermolekulare Marker-Funktionalität. Der Linker an der Base hat eine freie Aminogruppe, die modifiziert werden kann.

Das Produkt ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid: die Linker-Länge ist kleiner als 30 Atome, die Marker-Komponente ist niedermolekular. Das Nukleotid wird von Polymerasen als Substrat akzeptiert.

Beispiel 18:

(dUTP-AA-SS-Propionat)_m-Poly-Lysin-(Cy3)_n

Edukte:

dUTP-AA-PDTP

(HS-Propionat)_m-Poly-Lysin-(Cy3)_n, n = 10-15, m 3-9, Poly-Lysin 10.000-20.000

Zu 50 µl einer Lösung mit dUTP-AA-PDTP, 20 mmol/l, in 50 mM Borat-Puffer, pH 9,0, wurde 20 µl (HS-Propionat)_m-Poly-Lysin-(Cy3)_n, ca. 1 mmol/l, in Wasser zugegeben und 18 h bei RT gerührt. Das Produkt wurde durch Ultrafiltration, 30.000 MWCO, gereinigt.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten trägt. Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid: die Linker-Länge ist unter 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation des Nukleotids führt zum Verlust der Substrateigenschaften.

Beispiel 19:

dUTP-AA-PEG-Biotin, Fig. 25

Zu 100 µl wässriger Lösung dUTP-AA, 50 mmol/l, pH 8,0, wurden 10 mg Biotin-PEG-NHS gegeben und bei 40°C 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde das nicht umgesetzte Nukleotid durch Ultrafiltration, 3.000 MWCO, abgetrennt und mehrmals mit Wasser gewaschen. Ausbeute 6%, UV-VIS.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker. Biotin dient als Kopplungseinheit T. An diese Kopplungseinheit T können makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, z.B. Streptavidin, ohne dass die Substrateigenschaften dieser Analoga verloren gehen. Dieses Nuk-Makromolekül dient als Substrat für Polymerasen.

Biotin kann auch als eine niedermolekulare Marker-Einheit mit signalvermittelnder Funktion betrachtet werden, die an den langen Linker gekoppelt ist.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß eine Zwischenstufe eines Nuk-Makromoleküls: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome und an die Kopplungseinheit T können weitere Makromoleküle gekoppelt werden.

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Propargylamino-dCTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP (Fig. 26) können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 8 bis 11.

Beispiel 20:

TTP-3'-Amino-PEG-Biotin, Fig. 26

Die Synthese erfolgte ähnlich wie für dUTP-AA-PEG-Biotin, Beispiel 19. Als Edukte wurden 3'-Amino-3'-Deoxy-TTP und Biotin-PEG-NHS eingesetzt. Ausbeute 4%, UV-VIS.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker und eine niedermolekulare Marker-Einheit (Biotin), die eine signalvermittelnde Funktion hat. An das Biotin können makromolekulare signaltragende Streptavidin-Moleküle gekoppelt werden.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß eine Zwischenstufe eines Nuk-Makromoleküls: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist niedermolekular.

Auch andere Nukleotid-Analoga mit einer Amino-Gruppe in der 3'-Position können in ähnlicher Weise gekoppelt werden.

Beispiel 21:

dCTP-PA-PEG-Maleimid

Die Synthese erfolgte wie für dUTP-AA-PEG-Biotin, Beispiel 19 beschrieben. Als Edukte wurden dCTP-PA und Maleimid-PEG-NHS eingesetzt. Ausbeute 7%.

Diese Verbindung hat eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker. Kopplungseinheit T an diesem Linker ist die Maleimid-Gruppe. An Maleimid-Funktionalität können makromolekulare signaltragende Moleküle gekoppelt werden, die eine oder mehrere SH-Gruppen tragen.

Die Maleimid-Gruppe kann auch als eine niedermolekulare Marker-Einheit mit signalvermittelnder Funktion betrachtet werden, die an den langen Linker gekoppelt ist.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß eine Zwischenstufe eines Nuk-Makromoleküls: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist niedermolekular. An diese Marker-Komponente können makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, ohne dass die Substrateigenschaften dieser Analoga verloren gehen.

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Allylamino-dUTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP können wie oben

angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 8 bis 11.

Beispiel 22:

dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-(Cy3)-PEG-Biotin, Fig. 27

Die Synthese erfolgte wie für dUTP-AA-PEG-Biotin, Beispiel 19 beschrieben. Als Edukte wurden dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3 und Biotin-PEG-NHS eingesetzt. Ausbeute 5%.

Die Trennung vom nicht abreagierten dUTP-Analog erfolgte durch Ultrafiltration, 3.000 MWCO.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität, einen Farbstoff, einen makromolekularen Linker und eine niedermolekulare Marker-Funktionalität (Biotin), die eine signalvermittelnde Funktion hat. Biotin kann auch als eine Kopplungseinheit T des Linkers betrachtet werden.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß eine Zwischenstufe eines Nuk-Makromoleküls: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, Biotin dient als Kopplungseinheit T. An diese Kopplungseinheit T können makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, ohne dass die Substrateigenschaften dieser Analoga verloren gehen. Dieses Nuk-Makromolekül dient als Substrat für Polymerasen.

Der Farbstoff dient als sterisch anspruchsvolle Gruppe, die den enzymatischen Einbau von nur einem Nuk-Makromolekül in den wachsenden Strang durch die Polymrase zulässt. Die Eigenschaften solcher Nukleotide sind detailliert in WO 02/088382 beschrieben.

Beispiel 23:

dUTP-AA-SS-PEG-Biotin, Fig. 28

Zu 100 µl, 10 mmol/l Biotin-PEG-Ethyl-SH in 50 mM Borat, pH 9,5, wurde 50 µl 30 mmol/l dUTP-AA-PDTP in 50 mM Borat, pH 9,5 zugegeben. Reaktion wurde 18 Stunden bei RT gerührt. Die Trennung erfolgt wie für die Synthese von dUTP-AA-PEG-Biotin, Beispiel 19 beschrieben.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker. Biotin dient als Kopplungseinheit T. An diese Kopplungseinheit T können makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, z.B. Streptavidin, ohne dass die Substrateigenschaften dieser Analoga verloren gehen. Dieses Nuk-Makromolekül dient als Substrat für Polymerasen. Über Streptavidin können auch weitere makromoleküle, beispielsweise Enzyme oder Nukleinsäurenge koppelt werden.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß eine Zwischenstufe eines Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome.

Biotin kann auch als signalvermittelnde niedermolekulare Marker-Einheit bezeichnet werden. Die Linker-Komponente kann zusammen mit der Marker-Komponente von der Nuk-Einheit unter milden Bedingungen abgespalten werden. Dies kann beispielsweise von Vorteil sein, wenn eine Sequenzierung durch Synthese (WO 03/048387, WO 02/088382) durchgeführt wird, wobei nach jedem Detektionsschritt eine Entfernung der Marker notwendig ist.

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Propargylamino-dCTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP können wie

oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 8 bis 11.

Beispiel 24:

TTP-O-Propionat-SS-PEG-Biotin

Zur 100 µl Lösung von TTP-O-Propionat-SH, 10 mmol/l, in 50mM Borat-Puffer, pH 9,5, wurden 100 µl einer Lösung von Bis-Dithio-(Ethyl-PEG-Biotin), 0,5 mmol/l, in Wasser gegeben und 24 Stunden bei RT gerührt. Die Aufreinigung erfolgte durch Ultrafiltration mit 3.000 MWCO.

Beispiele für die Kopplung von Aminogruppen an die Phosphatreste der Nukleotide sind in D. Jameson et al. Methods in Enzymology 1997, V. 278, 363 angegeben. An diese Amino-Gruppe kann eine Linker-Komponente gekoppelt werden.

Kopplungen an Marker-Komponenten

Beispiel 25:

(dUTP-16-Biotin)₄-SA

Zu 200 µl einer Lösung von Biotin-16-dUTP 200 µmol/l in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, wurden 200 µl einer Streptavidin-Lösung, 1 mg/ml, in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, zugegeben. Nach 1 Stunde bei RT wurde das (dUTP-16-Biotin)₄-SA vom nicht umgesetzten Biotin-16-dUTP durch Ultrafiltration, 50.000 MWCO, abgetrennt.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten trägt.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid: die Linker-Länge ist kleiner als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular. Es kann stellvertretend für konventionell modifizierte Nukleotide mit einem makromolekularen Markern betrachtet werden.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation führt zum Verlust der Substrateigenschaften, s. Beispiel 34B.

Eigenschaften der Biotin-Streptavidin-Bindung sind z.B. in Gonzalez et al., Journal Biolog. Chem. 1997, v. 272, S. 11288 beschrieben.

Beispiel 26:

(dUTP-16-Biotin)₄-SA-Cy2

Die Kopplung von dUTP-16-Biotin an SA-Cy2 wurde wie für (dUTP-16-Biotin)₄-SA beschrieben durchgeführt.

Die Verbindung dient als Äquivalent zu Verbindung aus Beispiel 25, wobei zur Visualisierung Streptavidin fluoreszentmarkiert ist.

Beispiel 27:

dCTP-PA-SS-Oligo-dT30

Die Synthese erfolgte wie bei dUTP-AA-SS-MEA-Cy3 beschrieben. Zu dCTP-PA-PDTP, 100 µl, 20 mmol/l, wurde Oligo-dT30-3'-SH (MWG-Biotech) zugegeben, Endkonzentration 200 µmol/l und 18 Std bei RT, pH 9, gerührt. Die Aufreinigung erfolgte durch Ultrafiltration mit 3.000 MWCO.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid-Analog: die Linker-Länge ist kleiner als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation des Nukleotidteils führt zu Aufhebung der Substrateigenschaften.

Beispiel 28:

(dUTP-AA-PEG-Biotin)₄-SA-Cy2 und (dUTP-AA-PEG-Biotin)₄-SA, Fig. 29

Die Kopplung von dUTP-AA-PEG-Biotin an SA-Cy2 bzw. an SA wurde wie für (dUTP-16-Biotin)₄-SA beschrieben durchgeführt. Zu 200 µl 1 µg/µl Streptavidin wurden 10 µl einer Lösung von dUTP-AA-PEG-Biotin, ca. 1 mmol/l, gegeben, und bei RT 1 h gerührt.

Danach wurde das Produkt durch Ultrafiltration, 50.000 MWCO, von dem nicht gekoppelten dUTP-AA-PEG-Biotin abgetrennt und das Produkt zweimal mit Wasser gewaschen.

Ein Teil des gewonnenen (dUTP-AA-PEG-Biotin)₄-SA-Cy2 wurde mit Cy3-NHS modifiziert: 50 µl (dUTP-AA-PEG-Biotin)₄-SA-Cy2 wurden in 50 mmol/l Borat, pH 8,5, aufgelöst, bis zur Konzentration von 1,4 µg/µl, und anschließend mit Cy3-NHS versetzt. Endkonzentration von Cy3 betrug 10mmol/l. Die Reaktion wurde 1 h bei RT durchgeführt. Das Produkt, (dUTP-AA-PEG-Biotin)₄-SA-Cy2/Cy3, wurde durch Ultrafiltration mit 30.000 MWCO getrennt.

Dadurch wurde ein Nuk-Makromolekül hergestellt, dass sehr wenige freie Amino-Gruppen am Marker-Teil aufweist.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente trägt. Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular. Es kann stellvertretend für Nuk-Makromoleküle betrachtet werden.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert s. Beispiele 34, 35.

Auch andere Verbindungen, die einen langen Linker haben und ein Biotin-Molekül tragen (siehe Beispiele 20, 22, 23, 24), können ähnlich in der Synthese eingesetzt werden.

Beispiel 29:

(dUTP-AA-PEG-Biotin)₄-SA-Alkalische Phosphatase (Fig. 30) und (dUTP-AA-PEG-Biotin)₄-SA-QDot (Fig. 31)

Die Kopplung von dUTP-AA-PEG-Biotin an SA-AP bzw. QDot wurde wie für (dUTP-16-Biotin)₄-SA beschrieben durchgeführt.

Im Falle von QDot werden Nuk-Linker-Teile an der Oberfläche der QDots angeordnet. Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente mit einem Enzym bzw. Q-Dots trägt.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular. Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.

Auch andere Verbindungen, die einen langen Linker haben und ein Biotin-Molekül tragen (siehe Beispiele 20, 22, 23, 24), können ähnlich in der Synthese eingesetzt werden.

Beispiel 30:

(dUTP-AA-PEG-Biotin)₂-(dT31-TEG-Biotin)₂- SA-Cy2, Fig. 32

Die Kopplung von dUTP-AA-PEG-Biotin an SA-Cy2 wurde wie für (dUTP-16-Biotin)₄-SA beschrieben durchgeführt:

Zu 100 µl einer Streptavidin-Cy2-Lösung, 20 µmol/l (1.2 mg/ml), in Tris-HCl, 50 mmol/l, pH 8, wurden 80 µl 80 µmol/l dT31-3'-TEG-Biotin (MWG Biotech) zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. (TEG ist ein kurzer Linker zwischen Biotin und dT31). Danach wurden 100 µl einer Lösung dUTP-AA-PEG-Biotin 50 µmol/l in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, zugegeben. Nach 10 min bei RT wurde (dUTP-AA-PEG-Biotin)₂-(dT31-TEG-Biotin)₂- SA-Cy2 durch Ultrafiltration, 50.000 MWCO, gereinigt.

Die Substanz trägt eine Nukleosid-Triphosphat-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten (Oligo-dT31). Das Oligo-dT31 besteht aus Nukleosidmonophosphaten, die allerdings an der enzymatischen Reaktion nicht teilnehmen und nur eine signalvermittelnde Funktion haben. An ein solches Oligonukleotid können komplementäre Nukleinsäuren hybridisiert werden, die eine signalgebende Funktion haben (Fig. 32B). (allgemeine Regeln zur Hybridisierung von Nukleinsäuren sind dem Fachmann bekannt, Anderson "Nucleic Acid Hybridization", 1999).

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular. Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.

Dieses Derivat kann beispielsweise an Poly-dA oder poly-A (z.B. mit durchschnittlicher Länge 260NT, Amersham Bioscience) durch Hybridisierung gekoppelt werden. Sowohl ein einziges als auch mehrere (dUTP-AA-PEG-Biotin)₂-(dT31-Biotin)₂-SA-Cy2 Moleküle können an ein Poly-dA-Molekül gekoppelt werden, s.auch Fig. 5. Das Verhältnis wird durch die Konzentrationsverhältnisse bestimmt. Auch andere Oligonukleotide, beispielsweise markiert mit Farbstoffen, können zusammen mit(dUTP-AA-PEG-Biotin)₂-(dT31-Biotin)₂-SA-Cy2 an denselben Strang der Poly-dA oder poly-A gekoppelt werden, wobei die Verhältnisse zwischen einzelnen Molekülen variabel sind. Dadurch ist es möglich, ein polyfunktionales Nuk-Makromolekül herzustellen. Der große Vorteil eines solchen Nuk-Makromoleküls besteht in einer leicht spaltbaren makromolekularen Markierung: die an die poly-dA bzw. poly-A Stränge hybridisierten markierten Oligonukleotide können durch Denaturierung abgelöst werden. Durch die Wahl der Länge der markierten Oligonukleotide, kann die Schmelztemperatur (T_m) dieser Oligonukleotide für die jeweiligen Anforderungen der reversiblen Markierung angepasst werden. Die Regeln zur T_m-Berechnung sind dem Fachmann bekannt ("Molecular-Cloning", J. Sambrook, band 1-3, 2001). Beispielsweise können dT₂₅-Oligonukleotide, markiert mit einem Cy3-Molekül an Poly-dA gekoppelt werden. Durch den Einsatz von RNA, z.B. poly-A, zur Bindung mehrerer (dUTP-AA-PEG-Biotin)₂-(dT31-Biotin)₂-SA Moleküle, kann die Spaltung durch eine RNase erfolgen.

Da Streptavidin via Bindungsstellen für Biotin aufweist, entsteht ein Gemisch von Nuk-Makromolekülen, bei dem via Bindungsstellen unterschiedlich besetzt sind. Dieses Gemisch kann mit unterschiedlichen Mitteln getrennt werden. Eine der Möglichkeiten besteht in Isolierung von Nuk-Makromolekülen, die mindestens ein Oligo-dT31 tragen, beispielsweise durch eine Absorption an einem Anionenaustauscher (z.B. einer DEAE-Cellulose-Säule). Aufgrund eines großen Ladungsunterschieds zwischen den mit Oligonukleotiden markierten und nicht markierten Streptavidin-Molekülen lassen sich die Produkte leicht trennen.

Auch längere Nukleinsäureketten, die ein Biotin-Molekül tragen, beispielsweise poly-dA-Biotin, hergestellt beispielsweise durch eine terminale Kopplung von ddUTP-18-Biotin durch eine TdT-abhängige Reaktion ("Molecular-Cloning", J. Sambrook, Band 1-3, 2001), können in ähnlicher Weise an das Streptavidin gekoppelt werden, so dass Moleküle mit einer durchschnittlichen Zusammensetzung von $(\text{dUTP-AA-PEG-Biotin})_N\text{-(Nukleinsäureketten-Biotin)}_M\text{-SA}$ entstehen. Sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Nukleinsäureketten können gekoppelt werden. Die Länge der gekoppelten Nukleinsäureketten kann zwischen 10 und 100, 100 und 1000 Nukleotiden liegen.

Die hybridisierten Oligonukleotide, die einen Farbstoff tragen, können an den Poly-dA Strang auch kovalent durch Cross-Linker gebunden werden.

Auch andere Verbindungen, die einen langen Linker haben und ein Biotin-Molekül tragen (siehe Beispiele 20, 22, 23, 24), können ähnlich in der Synthese eingesetzt werden.

Beispiel 31:

$(\text{dUTP-AA-SS-PEG-Biotin})_4\text{-SA}$ und $(\text{dUTP-AA-SS-PEG-Biotin})_4\text{-SA-Cy2}$, Fig. 33

Die Kopplung von dUTP-AA-SS-PEG-Biotin an SA bzw. an SA-Cy2 wurde wie für $(\text{dUTP-AA-PEG-Biotin})_4\text{-SA}$ beschrieben durchgeführt. Als Edukte wurden Streptavidin und dUTP-AA-SS-PEG-Biotin eingesetzt.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente trägt. Die Linker-Komponente und die Marker-Komponente können von der Nuk-Einheit unter milden Bedingungen abgespalten werden.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular. Es kann stellvertretend für Nuk-Makromoleküle betrachtet werden, die eine unter milden Bedingungen spaltbare Verbindung in der Linker-Komponente tragen.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert s. Beispiel 34.

Beispiel 32:

dCTP-PA-PEG-Maleimid-S-Oligo-dT30, Fig. 34A

Zu 100 µl einer Lösung mit dCTP-PA-PEG-Maleimid, 5 mmol/l, in 50 mM Borat-Puffer, pH 9,5, wurde 100 µl einer Lösung von 3'-SH-Oligo-dT30, 200 µmol/l, in Wasser zugegeben und 48 h bei RT gerührt. Das Produkt wurde mittels präparativer Gel-Elektrophorese, 12% Polyacrylamid-Gel, gereinigt. Ausbeute 14%.

Die Substanz trägt eine Nukleosid-Triphosphat-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten (Oligo-dT30). Das Oligo-dT30 besteht aus Nukleotiden, die allerdings an der enzymatischen Reaktion nicht teilnehmen und nur eine signalvermittelnde Funktion haben. An ein solches Oligonukleotid können komplementäre Nukleinsäuren hybridisiert werden, die eine signalgebende Funktion haben (Fig. 34B). (allgemeine Regeln zur Hybridisierung von Nukleinsäuren sind dem Fachmann bekannt, Anderson "Nucleic Acid Hybridization", 1999).

Das Nukleotid ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Allylamino-dUTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 8 bis 11.

Durch Zugabe von Poly-dA oder Poly-A können mehrere dCTP-PA-PEG-Maleimid-S-Oligo-dT30, z.B. 10-20, zu einem Nuk-Makromolekül gekoppelt werden. Dabei entsteht ein Nuk-Makromolekül mit linear angeordneten Nuk-Linker-Komponenten (Fig. 34C).

Beispiel 33 :

$(\text{dCTP-PA-PEG-Maleimid-S})_n\text{-Poly-Lysin-(Cy3)}_m$

Edukte: dCTP-PA-PEG-Maleimid

$(\text{HS-Propionat})_m\text{-Poly-Lysin-(Cy3)}_n$, $n = 10-15$, $m = 3-9$, Poly-Lysin 10.000-20.000

Zu 100 µl einer Lösung mit dCTP-PA-PEG-Maleimid, 5 mmol/l, in 50 mM Borat-Puffer, pH 9,5, wurde 20 µl einer Lösung von $(\text{HS-Propionat})_m\text{-Poly-Lysin-(Cy3)}_n$, ca. 1 mmol/l, in Wasser, gegeben und 18 h bei 40°C gerührt. Das Produkt wurde durch Ultrafiltration, 30.000 MWCO, gereinigt.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente trägt. Pro Nuk-Makromolekül sind mehrere Nuk-Einheiten gekoppelt. Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.

Weitere Kombinationen von Nuk-Einheitn, Linker-Komponenten und Marker-Komponenten sind dem Fachmann naheliegend.

Vergleich von Substrateigenschaften einiger Vertreter von Nuk-Makromolekülen mit konventionell modifizierten Nukleotiden

Substrateigenschaften der Nuk-Makromoleküle gegenüber Polymerasen und Terminale deoxy-Nucleotidyl-Transferase (TdT) wurden mit den Eigenschaften der konventionell modifizierten Nukleotide in einer Markierungsreaktion verglichen. Allgemeine Prinzipien von Markierungsreaktionen findet man in "Molecular Cloning", J. Sambrook, Band 1-3, 2001, ISBN 0-87969-576-5.

Beispiel 34: Substrateigenschaften von Nuk-Makromolekülen oder konventionell modifizierten Nukleotiden für Polymerasen

Dieses Beispiel soll nicht zur Einschränkung der möglichen Markierungsreaktionen dienen, sondern lediglich Unterschiede in den Substrateigenschaften verdeutlichen.

In den Reaktionen wurden sowohl selbst synthetisierte als auch kommerziell erhältliche modifizierte Nukleotide dUTP-Cy3 (Amersham) und dUTP-16-Biotin (Roche) verwendet. Nicht modifizierte dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) wurden bei der Firma Roth erworben.

Als Matrizen dienten sowohl kurze Oligonucleotide als auch poly-dA. Primer und Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech synthetisiert.

Reaktionen wurden in 20 mmol/l Tris-Puffer, pH 8,5, 5 mmol/l MgCl_2 , 10% Glycerin, durchgeführt. Die Konzentrationen der Primer betrugen 1 $\mu\text{mol/l}$, die der Oligonukleotide 1 $\mu\text{mol/l}$ und die Konzentration der poly-dA, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (für die Konzentrationsverhältnisse an der festen Phase s.u.). Als Polymerase wurde Klenow exo- 1 Unit /100 μl (Amersham) verwendet. Die Konzentrationen von Nukleotiden betrugen 20 $\mu\text{mol/l}$ für konventionell modifizierte Nukleotide und 5 $\mu\text{mol/l}$ für Nuk-Makromoleküle. Nicht modifizierte Nukleotide wurden in Konzentrationen von 50 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt.

Zunächst wurden Primer an die jeweilige Matrize hybridisiert: Das Reaktionsgemisch ohne Polymerase wurde auf 75°C erhitzt und über 5 min auf 37°C abgekühlt. Danach wurde die Polymerase zugegeben. Alle Reaktionen wurden über 1 h bei 37°C durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration von 10 mmol/l) gestoppt.

Zu einigen Ansätzen wurde nach dem Stop der Reaktion Streptavidin, bis zu Endkonzentration von 1 mg/ml, zugegeben und der Ansatz weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Dadurch können bereits eingebaute Nukleotide, die ein Biotin tragen, mit Streptavidin reagieren und somit Streptavidin und Oligonukleotid verbinden. Diese Experimente eignen sich als Kontrolle für die Laufeigenschaften von modifizierten Primern.

Zu entsprechend gekennzeichneten Ansätzen wurde Mercaptoethanol (bis 20mmol/l Endkonzentration) zugegeben und der jeweilige Ansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert. Mercaptoethanol wurde bei einigen Anstzen während, bei anderen Ansätzen auch nach der Reaktion zugegeben.

Die Analyse der Reaktion erfolgte mittels denaturierender Gel-Elektrophorese, 20% Polyacrylamid-Gel, 50 mmol/l Tris-HCl, pH 8,7, wie in "Gel electrophoresis of nucleic Acids", Ed. D. Rickwood, 1990, dargestellt. Zur Denaturierung der Proben wurde anstatt von

7 M Urea eine erhöhte Temperatur bei der Gelelektrophorese eingesetzt (60°C). Die Elektrophorese wurde in Biorad-Gelkammern (Protean 3) durchgeführt, 200V, ca. 1 h. Die Visualisierung erfolgte auf einer UV-VIS Gel-Dokumentationsanlage (Biorad).

Beispiel 34A

Darstellung des Einbaus und Spaltung von einem konventionell modifizierten Nukleotid (dUTP-AA-SS-MEA-Cy3)

Sequenzen:

Primer:

Primer-T7-20-5'-Cy3: 5'- Cy3-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Matrize:

Oligonukleotid

Oligo 1: 5'-AGTTT^{TT}AGTTT^{TT}ACCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

Die Primer-Bindungsstelle ist unterstrichen

In dem in Fig. 35 gezeigten Gel ist auf den Spuren 1 bis 6 Folgendes gezeigt:

- 1) nur PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1
- 2) PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1+ dCTP-Cy3 + dATP + dGTP+ Polymerase
- 3) PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1+ dCTP-Cy3 + dATP + dGTP + dTTP+ Polymerase
- 4) PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1+ dUTP-AA-SS-MEA-Cy3 + Polymerase
- 5) nach 1 h wurde zu einem Aliquot von Ansatz 4 Mercaptoethanol zugegeben und weitere 10 min inkubiert, es erfolgt eine Abspaltung der Markierung
- 6) nach 10 min wurde zum Aliquot von Ansatz 5 dATP, dGTP zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert

Wie man sieht, wird dUTP-AA-SS-MEA-Cy3 von der Polymerase eingebaut (Spur 4). Der Farbstoff kann vom Primer abgespalten werden (Spur 5) (man sieht eine Verschiebung der

Bande, die durch die geringere Größe von Oigonukleotid zu begründen ist). Anschließend können weitere Nukleotide eingebaut werden (Spur 6).

Ein ähnlich durchgeführter Reaktionsansatz mit dUTP-AA-SS-TEAE-(Cy3)₂ führte nicht zum Einbau des Nukleotid-Analogs in den Primer.

Dieses Beispiel zeigt, dass sogar geringfügige Veränderungen in der Analog-Struktur, wie z.B. Verdopplung der Zahl der Farbstoffe, die an ein Nukleotid gekoppelt sind, zu Veränderung in Substrateigenschaften der Nukleotide führen können.

Beispiel 34B:

Vergleich von Substrateigenschaften eines konventionell modifizierten Nukleotid mit einem makromolekularen Marker und einem Nuk-Makromolekül

Sequenzen:

Primer:

Primer-dT₃₅-5'-Cy3 (dT35-Cy3): 5'-Cy3-

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Matrize:

Poly-dA (Amersham), durchschnittlich 270 Nukleotide lang.

Nukleotide: (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)₄-SA, (dUTP-16-Biotin)₄-SA, dUTP-16-Biotin

In dem in Fig. 36 gezeigten Gel ist Folgendes dargestellt:

Spuren 1-9:

- 1) Leiter: T-7-20-Cy3, dT35-Cy3, dT40-Cy3, dT50-Cy3 .
- 2) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase
- 3) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA
- 4) (dUTP-16-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase

5) (dUTP-16-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA

6) (dUTP-16-Biotin)₄-SA-Cy3 + dT35-Cy3 + Poly-dA

Im Kontroll-Ansatz, Spuren 7-9:

7) dUTP-16-Biotin + dT35-Cy3 + Poly-dA + Polymerase, Inkubation 1 std. 37°C danach + EDTA bis 10mmol/l Endkonzentration, danach + Streptavidin 10 min 37°C

8) dUTP-16-Biotin + dT35-Cy3 + Poly-dA + Polymerase, Inkubation 1 std. 37°C danach + EDTA bis 10mmol/l Endkonzentration,

9) Leiter: T-7-20-Cy3, dT35-Cy3, dT40-Cy3, dT50-Cy3

Ein Nuk-Makromolekül, (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)₄-SA, wird in den Primer eingebaut (Spur 2). Der markierte Primer hat nach dem Einbau eines Nuk-Makromoleküls eine stark veränderte elektrophoretische Beweglichkeit. Bloße Anwesenheit von Nuk-Makromolekülen hat keinen Einfluß auf den Primer (Spur 3).

Ein konventionell modifiziertes Nukleotid, (dUTP-16-Biotin)₄-SA, mit einem makromolekularen Marker wird nicht in den Primer eingebaut (Spur 4). Trotz der Anwesenheit der Polymerase in Reaktion 4 (Spur 4) lassen sich keine Unterschiede zwischen Spur 4 und Spur 5 feststellen.

Spur 6 zeigt die Position des konventionell modifizierten Nukleotids mit einem makromolekularen Marker, (dUTP-16-Biotin)₄-SA-Cy3, die obere Bande, und die Position des markierten Primers (die untere Bande).

Spur 7 zeigt das Ergebnis des Einbaus von dUTP-16-Biotin mit einer nachfolgenden Reaktion mit dem Streptavidin: die mit Biotin markierten Primer reagieren mit Streptavidin und verändern ihre Laufeigenschaften. Die nicht modifizierten Primer behalten ihre elektrophoretischen Eigenschaften bei.

Spur 8 zeigt das Ergebnis der Einbaureaktion eines konventionell modifizierten Nukleotides, dUTP-16-Biotin. Man sieht eine verbreitete Primer-Bande, die durch den Einbau von dUTP-16-Biotin in den Primer zustande kommt. Die Verlängerung von Primer ist eingeschränkt, da dUTP-16-Biotin nicht unbegrenzt nacheinander eingebaut werden kann, durchschnittlich wird ca. 3 dUTP-Analoga eingebaut, so dass die Länge von Primer durchschnittlich auf 38 NT ansteigt. Erwartungsgemäß führt der Einbau von konventionell modifizierten Nukleotiden mit einem niedermolekularen Marker nicht zu einer starken Veränderung in der elektrophoretischen Mobilität der Primer.

In diesem Experiment wurden Eigenschaften der Nuk-Makromoleküle, (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA, mit denen der Konventionell modifizierten Nukleotide verglichen.

Man sieht deutlich, dass die Kopplung eines makromolekularen Markers an kommerziell erhältliches dUTP-16-Biotin zum vollständigen Verlust der Substrateigenschaften der Nukleotide führt. Die Spuren 7 und 8 zeigen allerdings, dass die Polymerase sehr wohl in der Lage ist, dUTP-16-Biotin ohne makromolekularen Marker in den Primer einzubauen. Die Koppung von Streptavidin an das Biotin nach der Einbaureaktion führt zu genannten Veränderungen in Primer-Eigenaschaften.

Im Gegensatz dazu können Nuk-Makromoleküle (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA in den Primer ohne Schwierigkeiten durch die Polymerasen eingebaut werden. Das Auftreten von mehreren Banden im Gel führen die Erfinder auf einen mehrfachen Einbau von Nuk-Makromolekülen in den Primer (3 Banden) zurück.

Beispiel 34C:

Vergleich von Substrateigenschaften von Nuk-Makromolekülen, Einbau-Reaktion in der Lösung und an einer festen Phase

Sequenzen:

Primer:

Primer-dT-35-5'-Cy3 (dT35-Cy3): 5'-Cy3-

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Matrize:

Poly-dA (Amersham), durchschnittlich 270 Nukleotide lang.

Oligo-dA50-3'-TEG-Biotin (MWG-Biotech)

Nukleotide: (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA, (dU-AA-PEG-Biotin)4-SA

Streptavidin-polystyrene Particle, 2.17µ, Spherotech Inc,

Vorbereitung von Streptavidin-polystyrene Particle (feste Phase). Drei Ansätze wurden in gleicher Weise vorbereitet:

Je 0,5 ml der Lösung mit Kügelchen (im Hersteller-Puffer) wurde kurz zentrifugiert und Kügelchen-Pellet wurde in 100µl Einbaupuffer (20 mmol/l Tris, pH 8,5, 5 mmol/l MgCl₂) resuspendiert. Anschließend wurden 100 µl Oligo-dA50-3'-TEG-Biotin Konz. 50 µmol/l zugegeben und 1 h bei RT gerührt. In dieser Zeit binden die Oligo-dA-Moleküle an die Kügelchen. Anschließend wurden Kügelchen kurz abzentrifugiert und dreimal im Einbaupuffer gewaschen. Endvolumen der festen Phase betrug je 100 µl. Diese Menge an Oligo-dA50-feste-Phase kann Primer-dT-35-Cy3 in 2 µmol/l hybridisieren.

Die Hybridisierung von Primer-dT-35-Cy3 erfolgte bei 40°C 10 min, mit anschließender Abkühlung auf RT innerhalb von 10 min. Alle anderen Schritte wurden gleich bei allen Ansätzen durchgeführt.

In dem in Fig. 37 gezeigten Gel ist Folgendes dargestellt:

Spuren 1-10:

- 1) Leiter: dT35-Cy3, dT40-Cy3,
- 2) (dUTP-AA-PEG-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA + Polymerase
- 3) (dUTP-AA-PEG-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA
- 4) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA + Polymerase, Inkubation 1 h bei 37°C, dann + EDTA
- 5) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA + Polymerase, Inkubation 1 h bei 37°C, dann + EDTA, anschließend + Mercaptoethanol bis zu 200mmol/l (Endkonzentration), für 30 min.
- 6) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA + EDTA
- 7) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Oligo-dA50-feste-Phase + Polymerase, Inkubation 1 h bei 37°C, dann + EDTA
- 8) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Oligo-dA50-feste-Phase + Polymerase, Inkubation 1 h bei 37°C, dann + EDTA, anschließend + Mercaptoethanol bis zu 200mmol/l (Endkonzentration), für 30 min.
- 9) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Oligo-dA50-feste-Phase, vor Elektrophorese + EDTA
- 10) Leiter: dT35-Cy3, dT40-Cy3,

Man sieht deutlich das Ergebnis der Einbaureaktion von Nuk-Makromolekülen in den Spuren 2,4,5,7,8. Sowohl in der Lösung, als auch an der festen Phase läuft die enzymatische Markierungsreaktion gut ab.

Nach Zugabe von Mercaptoethanol zu mit EDTA gestoppten Reaktionen erfolgt die Abspaltung von Linker-Komponenten mit dem gebundenen Streptavidin von den Primern. Dies führt zu Wiederherstellung der elektrophoretischen Eigenschaften der Primer. Die

Verschiebung der Primer-banden in Spuren 5 und 8 ist durch multiplen Einbau von Nuk-Makromolekülen in die Primer zu begründen. Tatsächlich, liegen die Primer-Banden nach der Spaltung in Höhe von dT40-Cy3 (s. Leiter). Dies bedeutet, dass bis zu 5 Nuk-Makromolekülen während der Reaktion in die Primer eingebaut wurden.

Beispiel 35:

Substrateigenschaften der Nuk-Makromoleküle und konventionell modifizierter Nukleotide für Terminaler Transferase (TdT)

Die Reaktion wurde nach Angaben des Kit-Herstellers (Roche) durchgeführt: Auf jeweils 50 µl Volumen wurden zugegeben: 10 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl TdT (25 Units), 5 µl 25 mmol/l CoCl₂. Die Primer- und Nukleotid-Konzentrationen waren wie bei den Polymerase-Reaktionen. Die Reaktion wurde für 2 h bei 37°C durchgeführt.
Primer: Primer-dT₃₅-5'-Cy3 (dT35-Cy3), Primer-dT₃₅ (dT35)

In dem in Fig. 38 gezeigten Gel ist Folgendes dargestellt:

- 1) (dUTP-AA-PEG-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + TdT
- 2) (dUTP-AA-PEG-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3
- 3) dUTP-Cy3 (Amersham)+ dT35 + TdT
- 4) dUTP-Cy3 (Amersham)+ dT35
- 5) dUTP-16-Biotin (Roche) + dT35-Cy3 + TdT;
- 6) Ansatz 5; nach dem Stop + Streptavidin
- 7) Streptavidin -Cy2
- 8) (dUTP-16-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + TdT
- 9) (dUTP-16-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3
- 10) (dUTP-16-Biotin)₄-SA-Cy2

In der Spur 1 sieht man deutlich 2 Banden, die Bande in der Mitte entspricht dem dT35-Cy3, die obere Bande entspricht dem Reaktionsprodukt, Nuk-Makromolekül wurde in dT35 eingebaut. Spur 2 dient als Negativkontrolle. In Spur 3 sieht man das Ergebnis der Markierung des dT35 mit dem konventionellen Nukleotid dUTP-Cy3, Spur 4 ist die Negativkontrolle. In Spur 5 ist das Ergebnis der Kopplung von dUTP-16-Biotin an die dT35-Cy3 schlecht zu erkennen. In Spur 6 sieht man allerdings eine schwache obere Bande, die dem Ergebnis der Reaktion des mit dUTP-16-Biotin modifizierten Primers mit Streptavidin entspricht. Spur 7 zeigt die Position des modifizierten Streptavidins. In Spur 8 und 9 sieht man nur eine Bande, die dem dT35-Cy3 entspricht, was eindeutig darauf deutet, dass konventionell modifizierten Nukleotide mit einem makromolekularen Marker von TdT nicht eingebaut werden. Spur 10 zeigt die Position des (dUTP-16-Biotin)₄-SA-Cy2 im Gel.

Patentansprüche

1. Verbindung, umfassend mindestens eine Nukleotid- und/oder Nukleosid-Einheit, die über eine Linker-Einheit mit einer Marker-Einheit verbunden ist,
dadurch gekennzeichnet, dass die Linker-Einheit mindestens 50 Kettenatome umfasst.
2. Verbindung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass die Linker-Einheit an die Base, den Zuckerring und/oder die Phosphatgruppen des Nukleotids und/oder des Nukleosids koppelbar ist.
3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass die Linker-Einheit kovalent oder über zwischenmolekulare Kräfte an das Nukleotid und/oder Nukleosid koppelbar ist.
4. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung zwischen Nukleotid und Linker-Einheit und/oder Nukleosid und Linker-Einheit und/oder eine Bindung innerhalb der Linker-Einheit selektiv spaltbar ist.
5. Verbindung nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet, dass die selektiv spaltbare Bindung eine chemisch spaltbare Bindung, eine enzymatisch spaltbare Bindung und/oder eine photolabile Bindung ist.
6. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung zwei bis 1.000 Nukleotide und/oder Nukleoside umfasst, die jeweils über eine Linker-Einheit mit der Marker-Einheit verbunden sind.

7. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Linker-Einheit 50 bis 10.000 Kettenatome umfasst.

8. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Linker-Einheit ausgewählt ist aus Polyethylenglykol, Polysacchariden, Dextran, Polyamiden, Polypeptiden, Polyphosphaten, Polyacetaten, Polyalkylenglykolen, Copolymeren aus Ethylenglykol und Propylenglykol, polyolefinischen Alkoholen, Polyvinylpyrrolidonen, Polyhydroxyalkylmethacrylamiden, Polyhydroxyalkylmethacrylaten, Poly(α -hydroxysäuren), Polyacrylsäure, Polyacrylamid und/oder Polyvinylalkohol.

9. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Marker-Einheit mindestens eine detektierbare Einheit und/oder mindestens eine signalvermittelnde Einheit, an die eine detektierbare Einheit koppelbar ist, ist.

10. Verbindung nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung eine bis 1.000 detektierbare und/oder signalvermittelnde Einheiten umfasst.

11. Verbindung nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet, dass die detektierbare Einheit ausgewählt ist aus radioaktiven Isotopen und/oder Farbstoffen.

12. Verbindung nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet, dass die signalvermittelnde Einheit ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Biotin, Haptenen, seltenen Erden, Nanokristallen, Proteinen, Nukleinsäuren, Teilchen und Modifikationen davon.

13. Verbindung nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet, dass die signalvermittelnde Einheit eine Einheit ist, an die eine Vielzahl von Linker-Einheiten und/oder eine Vielzahl von detektierbaren Einheiten und/oder eine Vielzahl weiterer signalvermittelnder Gruppen koppelbar ist.

14. Verbindung nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet, dass die signalvermittelnde Einheit ausgewählt ist aus wasserlöslichen Polymeren, Nukleinsäuren, Streptavidin, Avidin, Dendrimeren und/oder Derivaten davon.

15. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die detektierbare Einheit an die Linker-Einheit und/oder die signalvermittelnde Einheit an die Linker-Einheit kovalent oder über zwischenmolekulare Wechselwirkungen koppelbar ist.

16. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die detektierbare Einheit kovalent oder über zwischenmolekulare Wechselwirkungen an die signalvermittelnde Einheit koppelbar ist.

17. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Kopplung zwischen Linker-Einheit und detektierbarer Einheit und/oder zwischen Linker-Einheit und signalvermittelnder Einheit selektiv spaltbar ist.

18. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung zwischen signalvermittelnder und detektierbarer Einheit selektiv spaltbar ist.

19. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass Nukleotid und/oder Nukleosid und/oder die Linker-Einheit und/oder die Marker-Einheit sterisch anspruchsvoll sind, so dass nach Einbau der Verbindung in DNA oder RNA der Einbau weiterer Nukleotide inhibiert ist.

20. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, mit einer in den Figuren 6A und/oder 6B dargestellten Strukturformel, wobei die Substituenten die folgenden Bedeutungen aufweisen:

Base: Adenin, 7-Deazaadenin, Guanin, 7-Deazaguanin, Thymin, Cytosin, Uracil, und/oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähige Modifikationen;

L: Linker-Einheit;

R₂: H, OH, Halogen, NH₂, SH und/oder eine mit herkömmlichen Schutzgruppen versehene OH-Gruppe;

R₃: H, OH, Halogen, PO₃, SH, NH₂, O- R₃₋₁, P- R₆, NH-R₆, S-R₆ und/oder Si-R₆, wobei R₆ eine chemisch, photochemisch oder enzymatisch spaltbare Gruppe ist;

R₄: H und/oder OH; und

R₅: OH, eine mit herkömmlichen Schutzgruppen versehene OH-Gruppe, Monophosphat, Diphosphat und/oder Triphosphat.

21. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Nukleotid bzw. Nukleosid an die Linker-Einheit über eine chemische Einheit koppelbar ist, die ausgewählt ist aus R₆-NH-R₇, R₆-O-R₇, R₆-S-R₇, R₆-SS-R₇, R₆-CO-NH-R₇, R₆-NH-CO-R₇, R₆-CO-O-R₇, R₆-O-CO-R₇, R₆-CO-S-R₇, R₆-S-CO-R₇, R₆-P(O)₂-R₇, R₆-Si-R₇, R₆-(CH₂)_n-R₇, R₆-(CH₂)_n-R₇, R₆-A-(CH₂)_n-R₇, R₆-(CH₂)_n-B-R₇, R₆-(CH=CH-)_n-R₇, R₆-(A-CH=CH-)_n-R₇, R₆-(CH=CH-B-)_n-R₇, R₆-A-CH=CH-(CH₂-)_n-R₇, R₆-(-CH=CH-CH₂)_n-B-R₇, wobei R₆ das Nukleotid und/oder Nukleosid ist;

R₇ die Linker-Einheit ist, und

A und B folgende chemische Einheiten umfassen: -NH-, -O-, -S-, -SS-, -CO-NH-, -NH-CO-, -CO-O-, -O-CO-, -CO-S-, -S-CO-, -P(O)₂-, -Si- und/oder -(CH₂)_n-, wobei n - gleich 1 bis 5 ist.

22. Population von Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 21, **dadurch gekennzeichnet**, dass sämtliche Verbindungen dieselbe Anzahl an Nukleotid- und/oder Nukleosid-Einheiten aufweisen.

23. Population von Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 21 mit einer definierten durchschnittlichen Zahl an Nukleotid- oder Nukleosid-Einheiten pro Verbindung.

24. Population von Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 21, wobei sämtliche Verbindungen dieselbe Anzahl an detektierbaren Einheiten aufweisen.

25. Population von Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 21 mit einer definierten durchschnittlichen Zahl an detektierbaren Einheiten pro Verbindung.

26. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 21,

wobei das Verfahren in einer ersten Alternative die folgenden Schritte umfasst:

(a) Umsetzung mindestens eines Nukleotids oder Nukleosids mit mindestens einer Linker-Einheit, die mindestens 50 Kettenatome umfasst, wobei die Kopplung der Linker-Einheit an die Base, den Zuckerring und/oder die Phosphatgruppen des Nukleotids oder Nukleosids erfolgt; und

(b) Umsetzung der Verbindung aus Schritt (a) mit mindestens einer detektierbaren Einheit und/oder mindestens einer signalvermittelnden Einheit, an die eine detektierbare Einheit koppelbar ist;

und wobei das Verfahren in einer zweiten Alternative die folgenden Schritte umfasst:

(a) Umsetzung mindestens einer Linker-Einheit mit mindestens einer detektierbaren Einheit und/oder mindestens einer signalvermittelnden Einheit, an die eine detektierbare Einheit koppelbar ist; und

(b) Umsetzung der Verbindung aus Schritt (a) mit mindestens einem Nukleotid oder Nukleosid, wobei die Kopplung der Linker-Einheit an die Base, den Zuckerring und/oder die Phosphatgruppen des Nukleotids oder Nukleosids erfolgt.

27. Verfahren nach Anspruch 26,
dadurch gekennzeichnet, dass Schritt (b) bei der ersten Alternative erst nach Einbau der Verbindung aus Schritt (a) in Nukleinsäuren erfolgt.

28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27,
dadurch gekennzeichnet, dass die Kopplung zwischen Nukleotid- und/oder Nukleosid-Einheit und/oder Linker-Einheit und/oder detektierbarer Einheit und/oder signalvermittelnder Einheit kovalent oder über zwischenmolekulare Wechselwirkungen erfolgt.

29. Verwendung der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 21 zum Einbau in Nukleinsäuren, insbesondere zur Markierung von Nukleinsäuren.

30. Verwendung nach Anspruch 29,
dadurch gekennzeichnet, dass der Einbau in Flüssigphase oder Festphase erfolgt.

31. Verwendung nach Anspruch 29 oder 30,
dadurch gekennzeichnet, dass Verbindungen, deren Nukleobasen des jeweils in die Nukleinsäure eingebauten Nukleotids identisch sind, mit identischen detektierbaren Einheiten versehen sind und/oder über signalvermittelnde Einheiten mit identischen detektierbaren Einheiten versehen sind.

32. Verwendung nach Anspruch 31,
dadurch gekennzeichnet, dass die detektierbare Einheit für die jeweilige Nukleobase spezifisch ist.

33. Verwendung nach einem der Ansprüche 29 bis 32,
dadurch gekennzeichnet, dass der Einbau an mehreren, hinsichtlich ihrer Nukleinsäuresequenz jeweils einheitlichen Populationen von an einer festen Phase fixierten Nukleinsäuremolekülen erfolgt, wobei jede Population eine adressierbare Position auf der festen Phase aufweist.

34. Verwendung nach Anspruch 33,
dadurch gekennzeichnet, dass sich mindestens zwei der Populationen von Nukleinsäuremolekülen in ihrer Nukleinsäuresequenz unterscheiden.

35. Verwendung nach einem der Ansprüche 29 bis 32,
dadurch gekennzeichnet, dass der Einbau an zufällig an einer festen Phase fixierten Nukleinsäuremolekülen erfolgt.

36. Verwendung nach einem der Ansprüche 29 bis 35,
dadurch gekennzeichnet, dass die Markierung nach Einbau der Verbindung in eine Nukleinsäure an dem verlängerten Nukleinsäurestrang verbleibt und nicht abgetrennt wird.

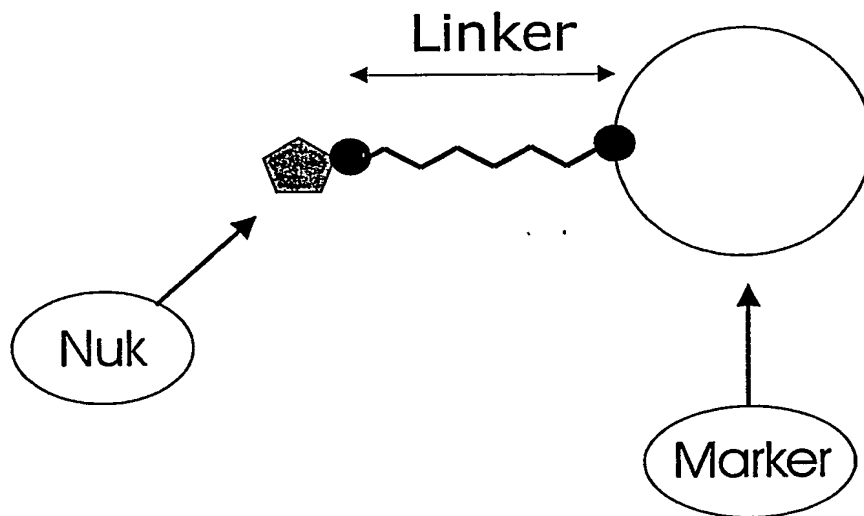
37. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 35,
dadurch gekennzeichnet, dass die Markierung durch den Einbau der Verbindung in eine
Nukleinsäure von der Nukleotid- oder Nukleosid-Einheit abgetrennt wird.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft modifizierte Nukleotide und Nukleoside, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie die Verwendung dieser modifizierten Nukleotide und Nukleoside zur Markierung von Nukleinsäuren.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein modifiziertes Nukleotid, umfassend mindestens eine Nukleotid- und/oder Nukleosid-Einheit die über eine Linker-Einheit mit einer Marker-Einheit verbunden ist, wobei die Linker-Einheit mindestens 50 Kettenatome umfasst.

Fig. 1



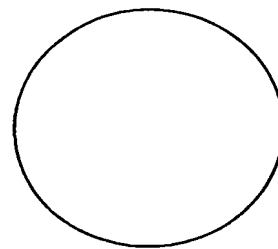
Legende:



Nuk-Einheit

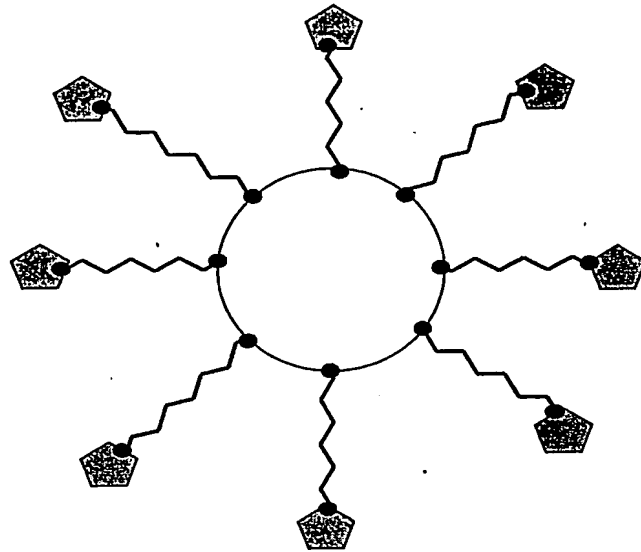


Linker-Einheit



Marker-Einheit

Fig. 2



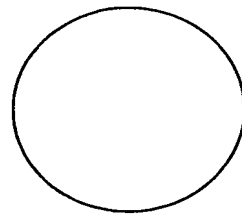
Legende:



Nuk-Einheit

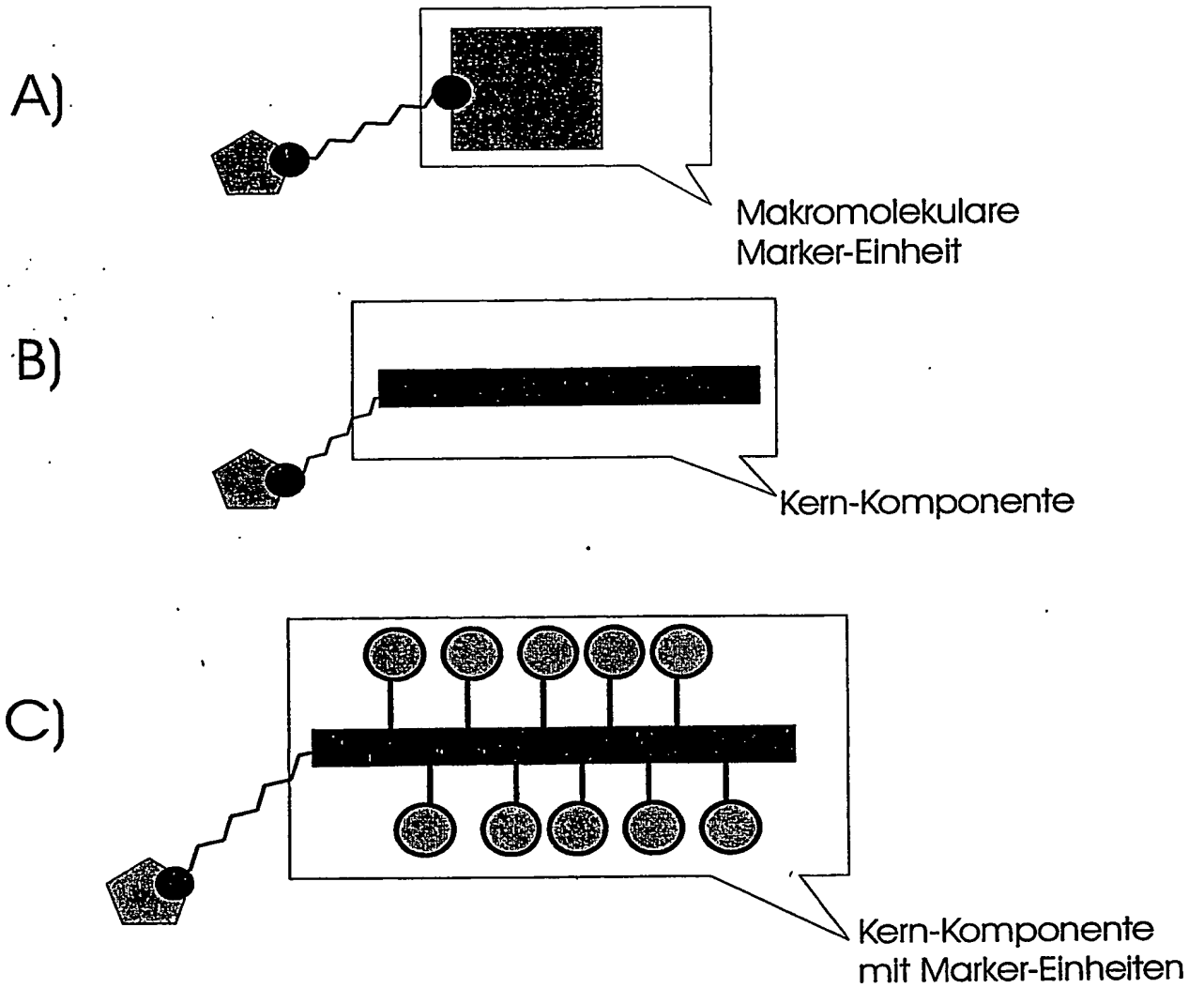


Linker-Einheit



Marker-Komponente

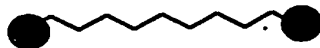
Fig. 3



Legende:

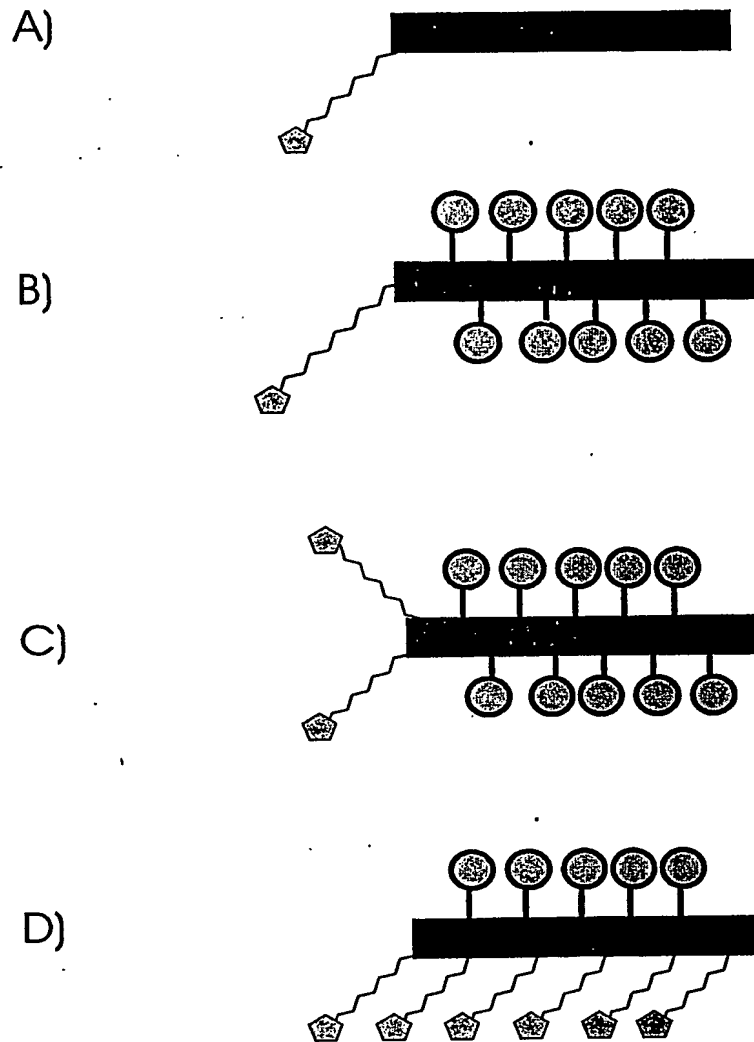


Nuk-Einheit



Linker-Einheit

Fig. 4



Legende:



Nuk-Einheit



Linker-Einheit



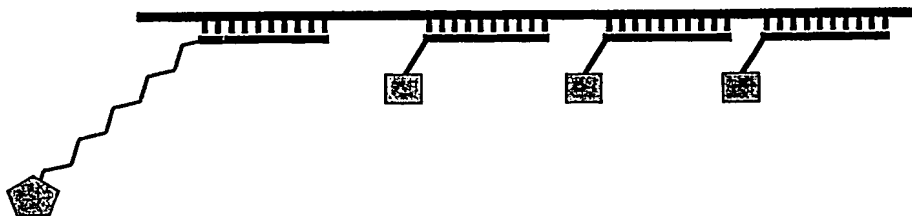
Kern-Komponente



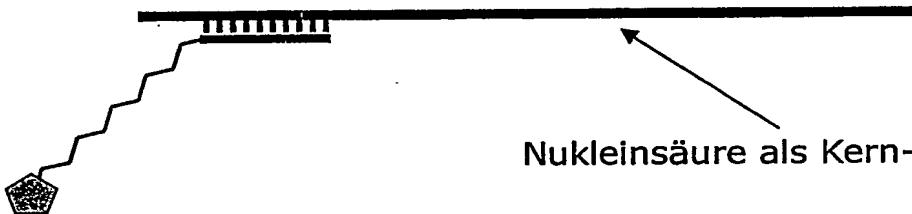
Marker-Einheit
an einem Linker

Fig. 5

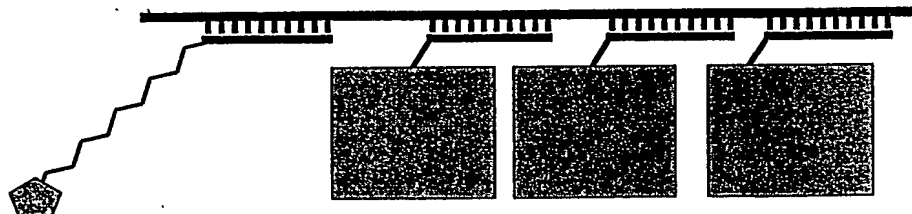
A)



B)



C)



Legende:



Nuk-Einheit

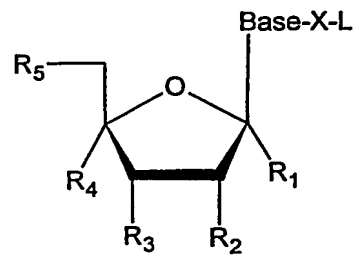


Linker-Einheit

Signalgebende
Marker-EinheitNucleinsäure mit
einer signalgebenden
Marker-Einheit

Fig. 6

A)



B)

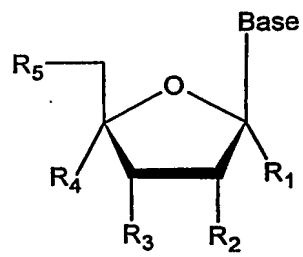


Fig. 7

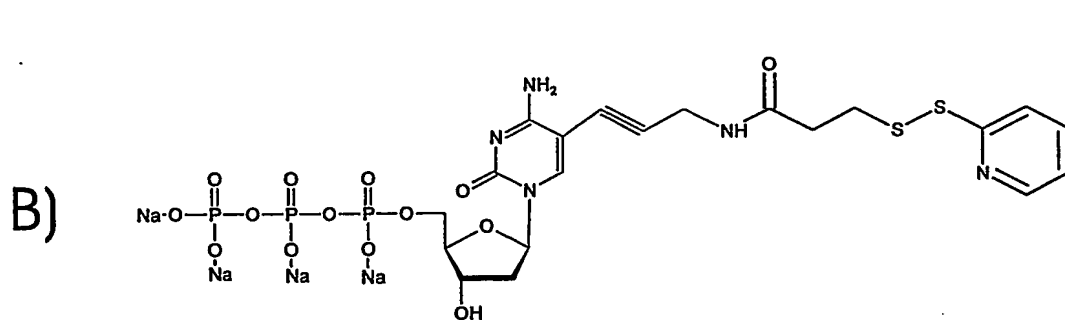
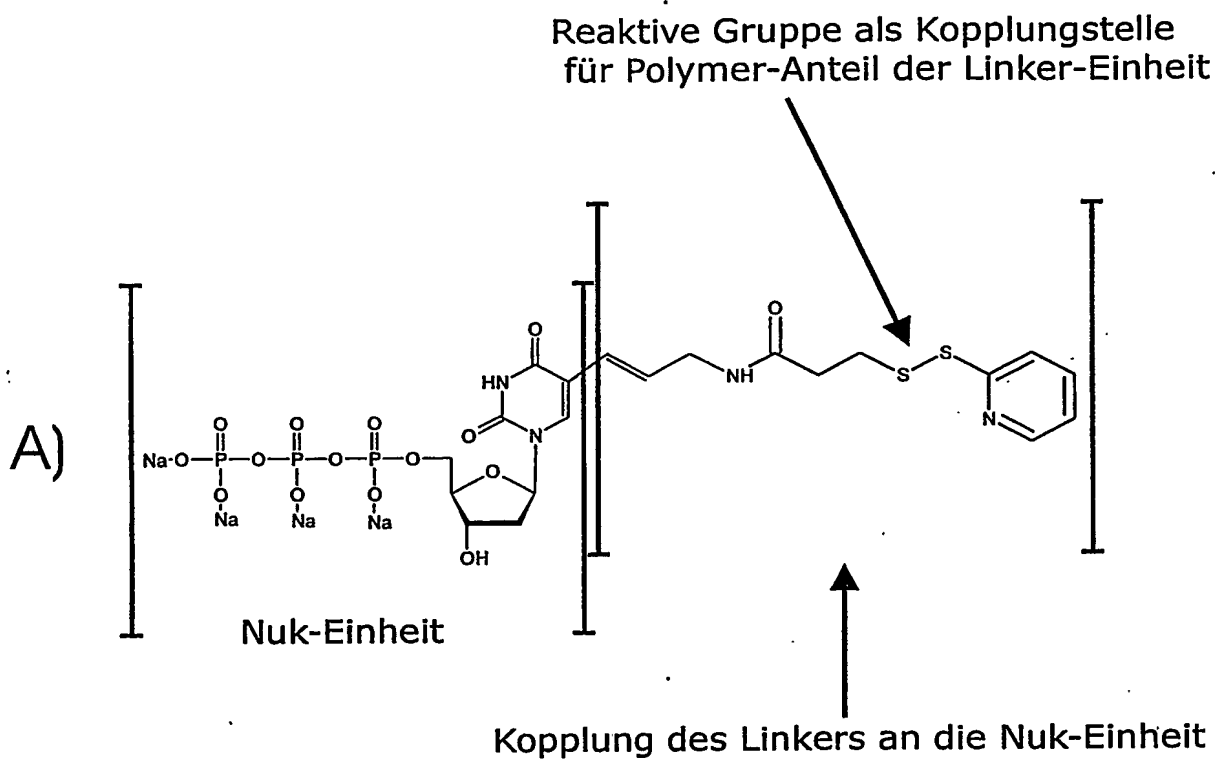


Fig. 8

Reaktive Gruppe als Kopplungstelle
für Polymer-Anteil der Linker-Einheit

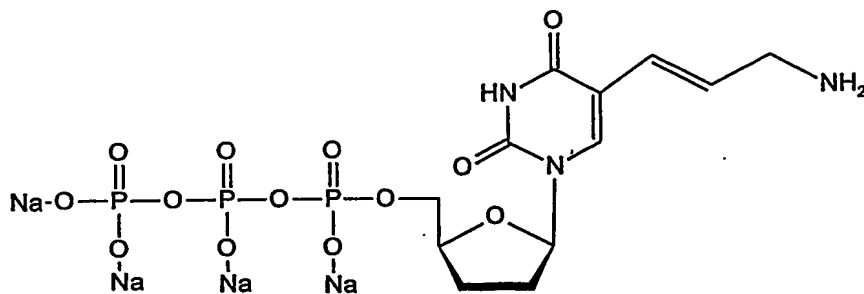
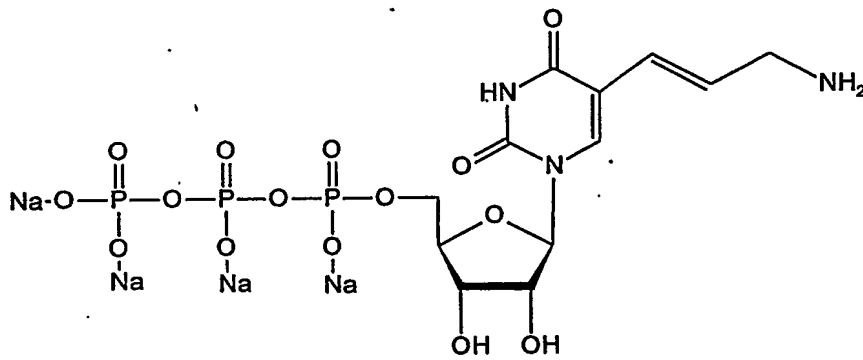
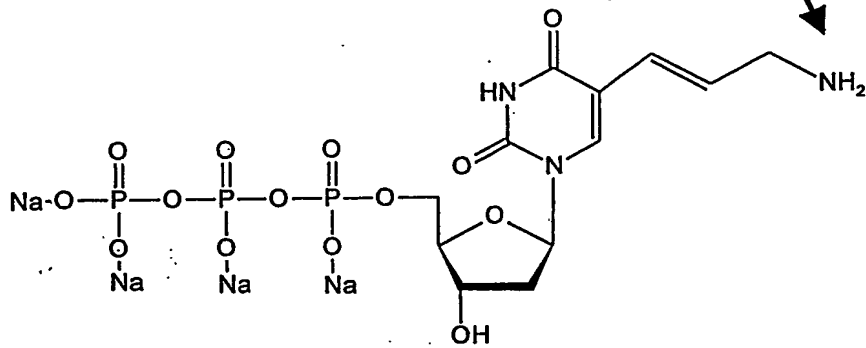


Fig. 9

Reaktive Gruppe als Kopplungsstelle
für Polymer-Anteil der Linker-Einheit

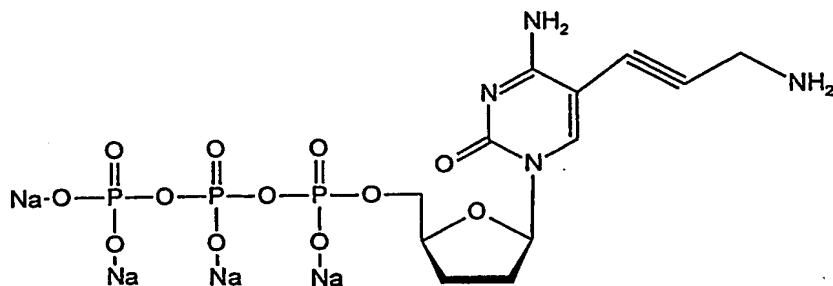
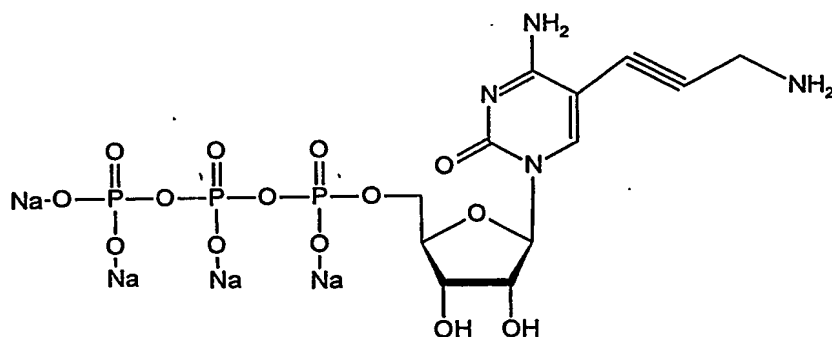
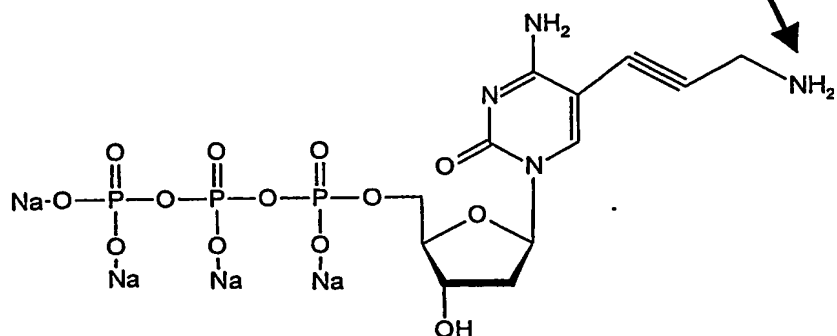


Fig. 10

Reaktive Gruppe als Kopplungsstelle
für Polymer-Anteil der Linker-Einheit

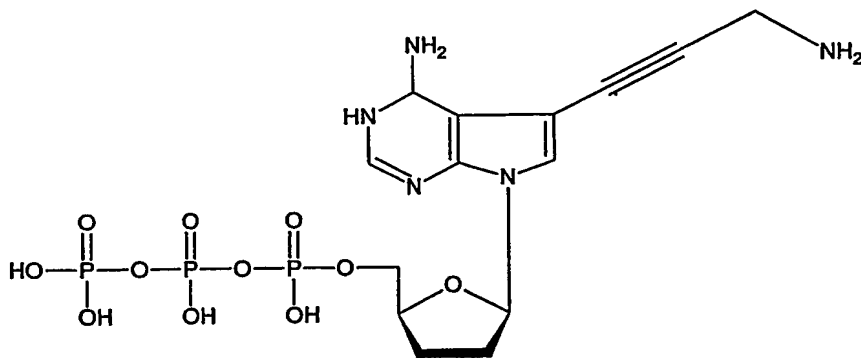
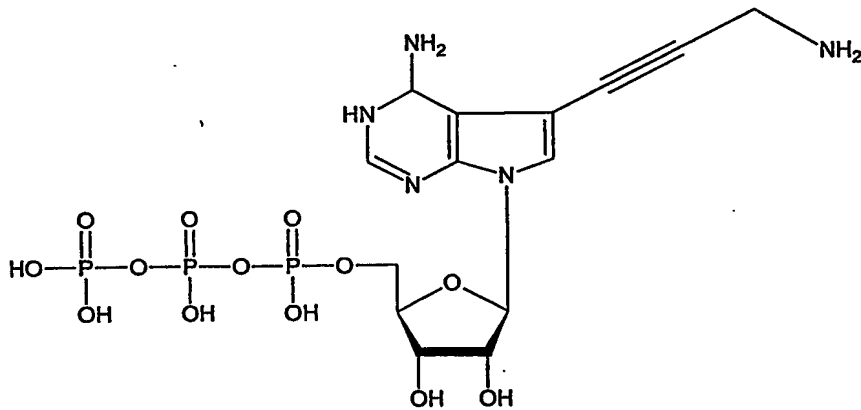
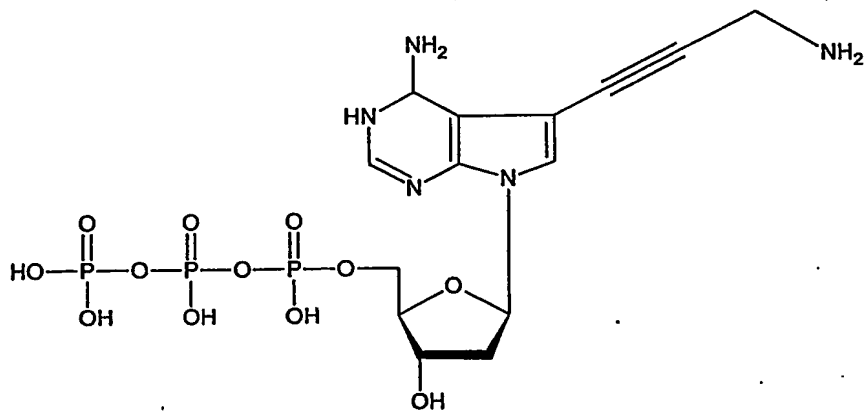


Fig. 11

Reaktive Gruppe als Kopplungstelle
für Polymer-Anteil der Linker-Einheit

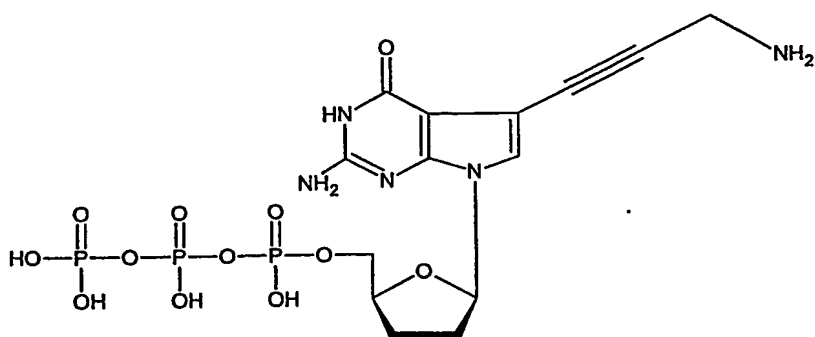
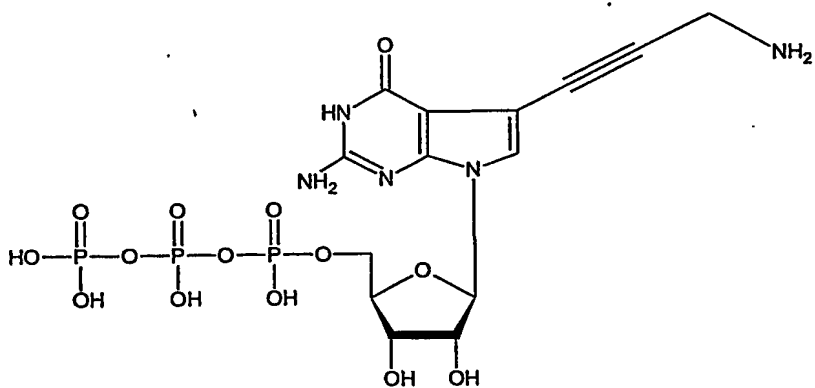
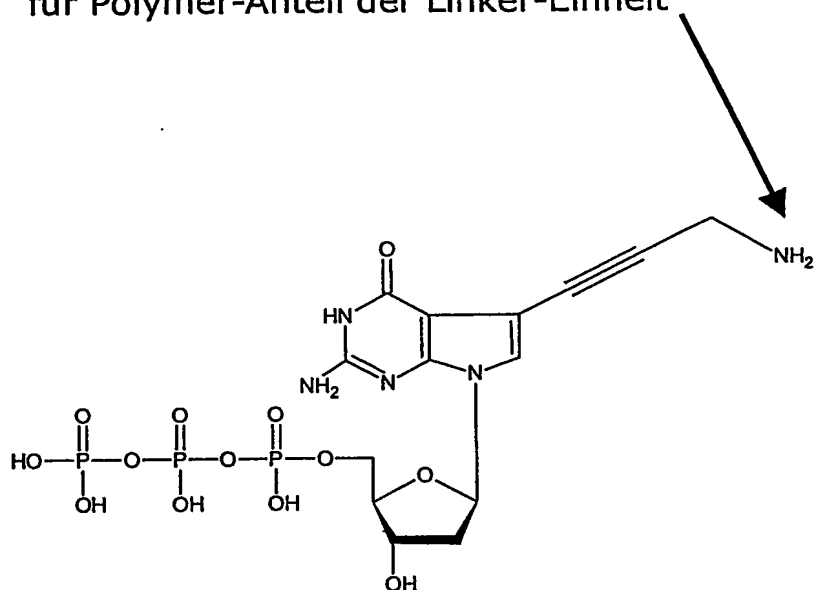


Fig. 12

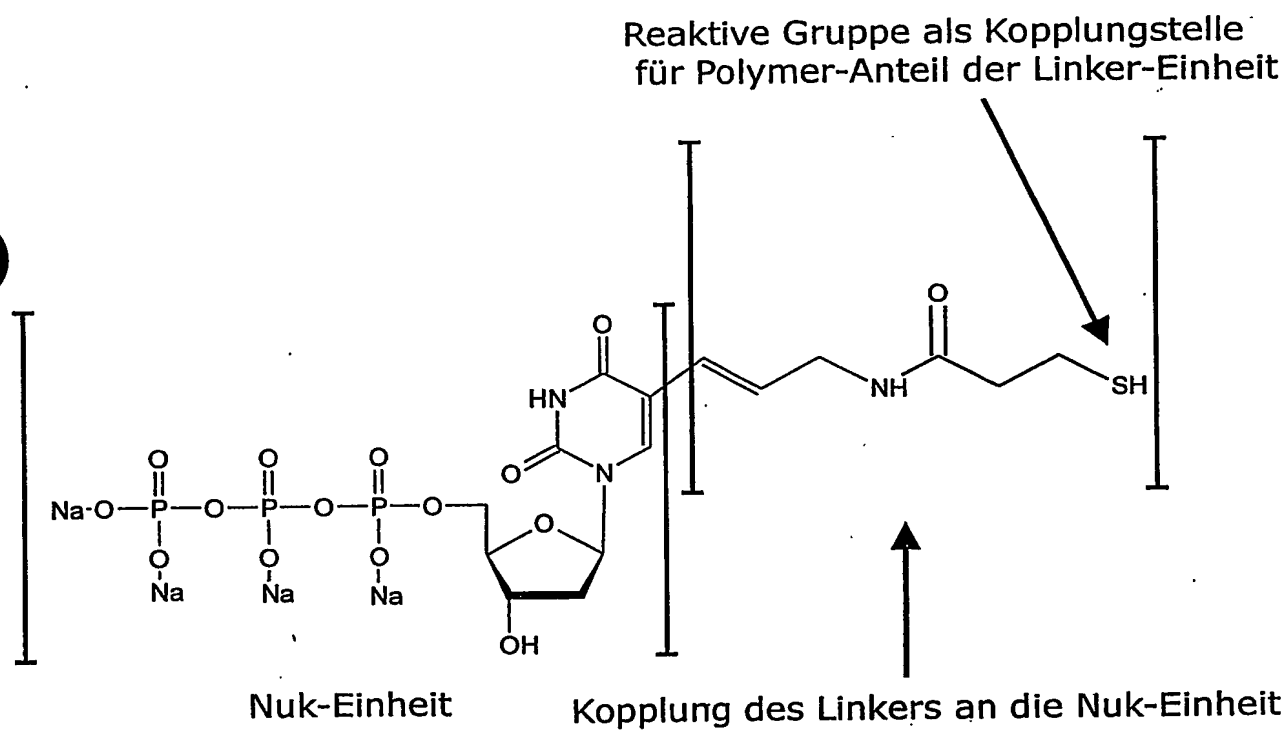


Fig. 13

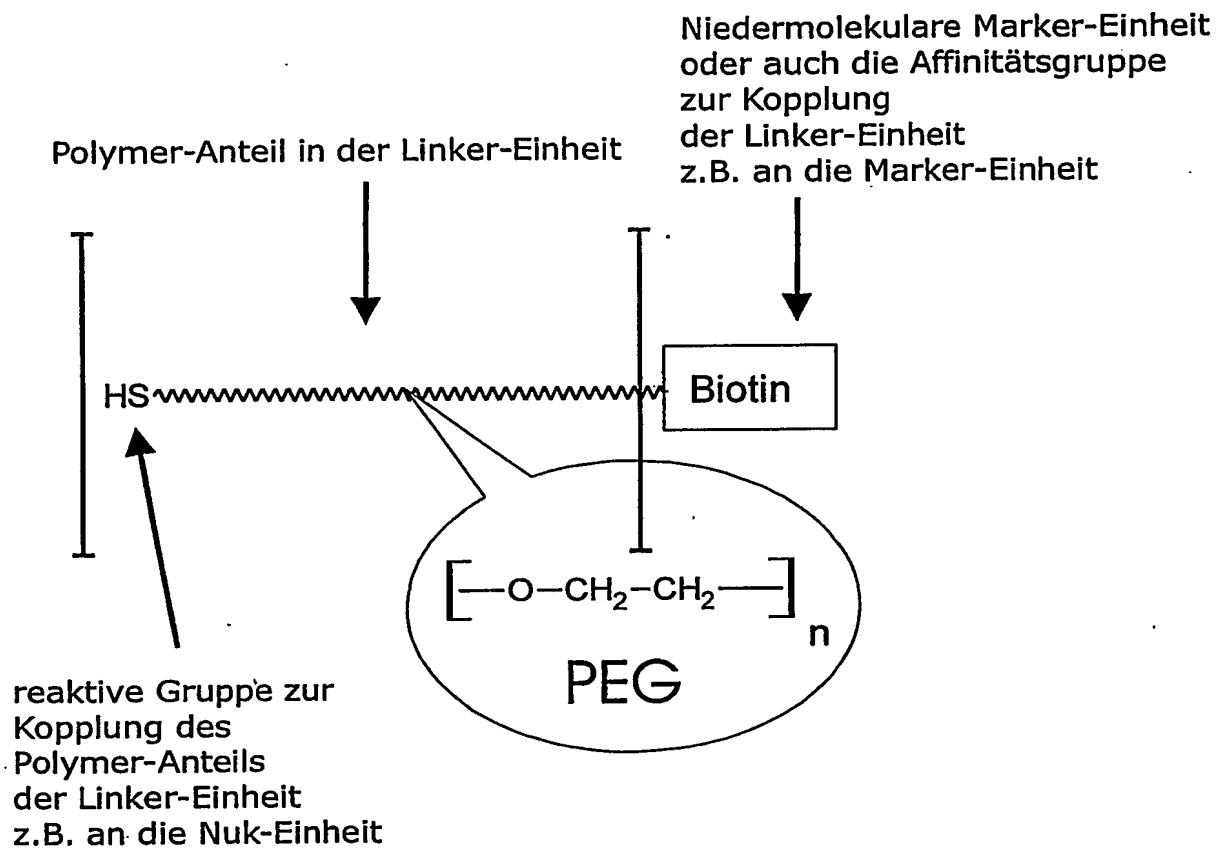


Fig. 14

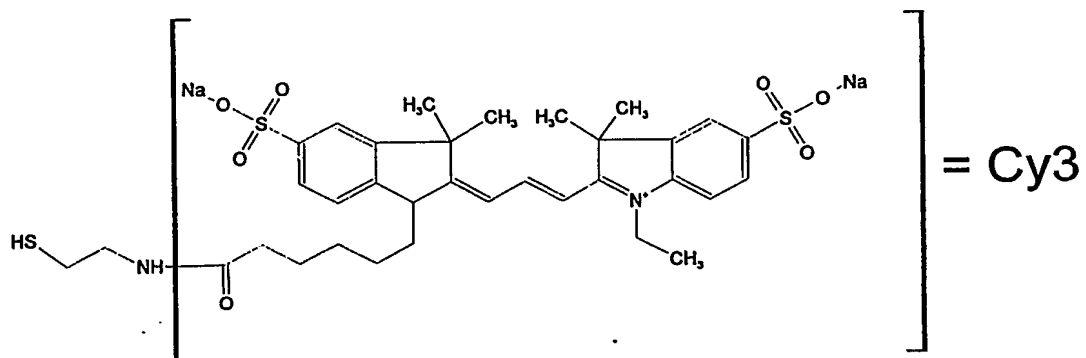
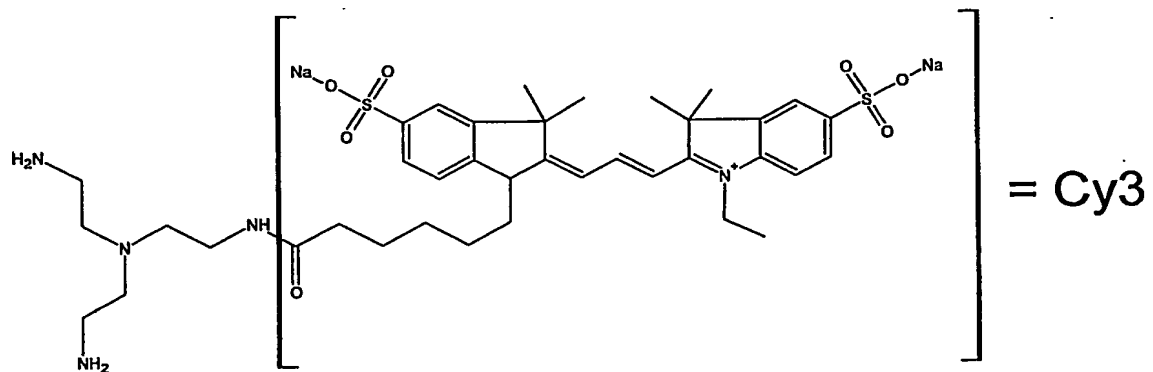


Fig. 15



Cy3

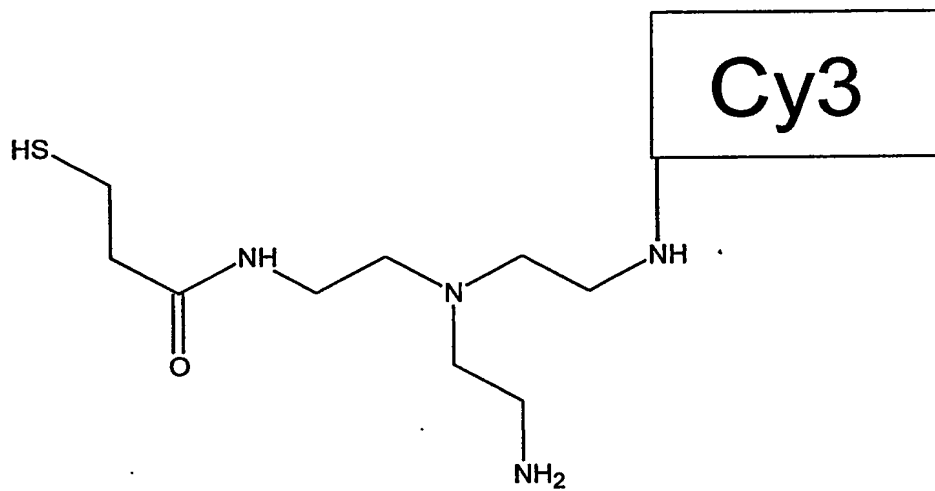


Fig. 17

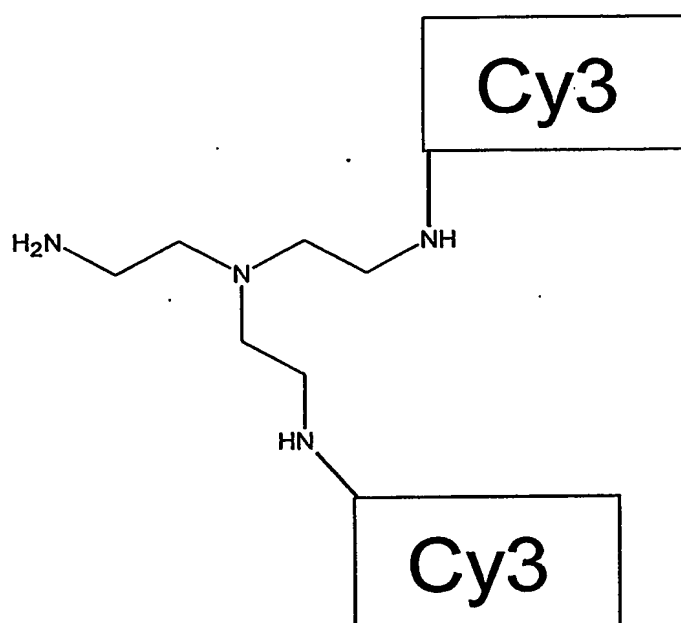
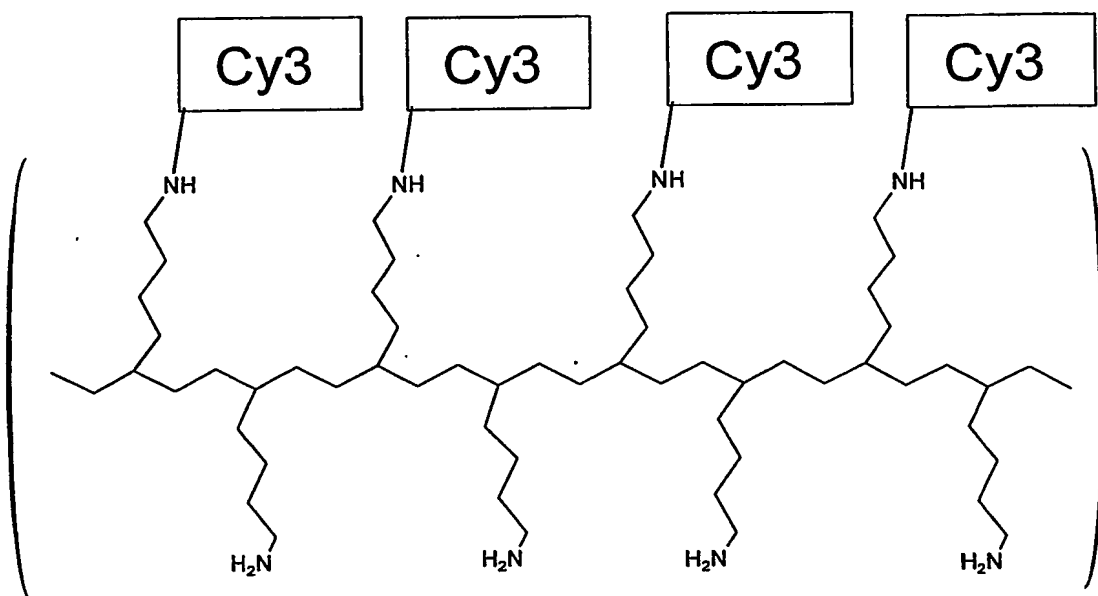


Fig. 18



Cy3

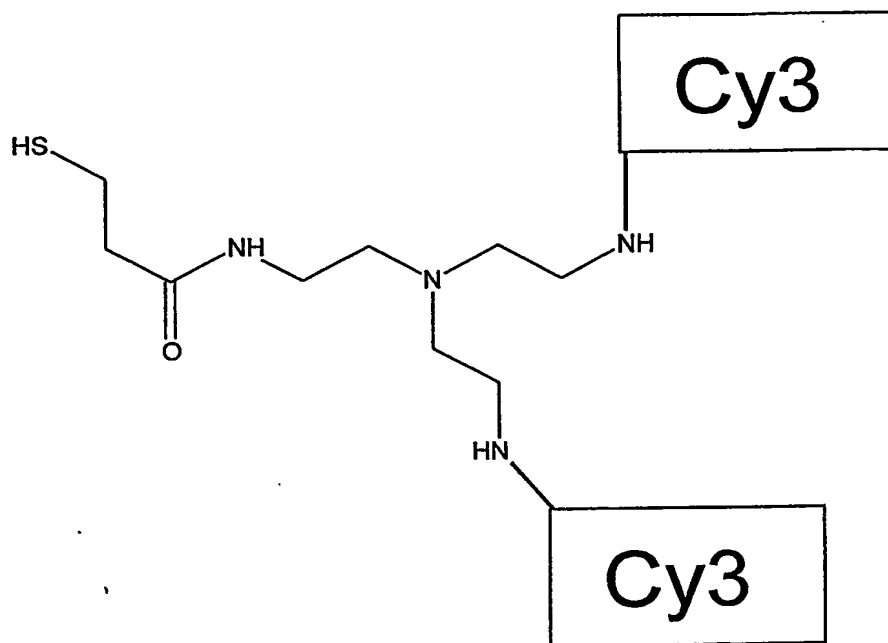


Fig. 20

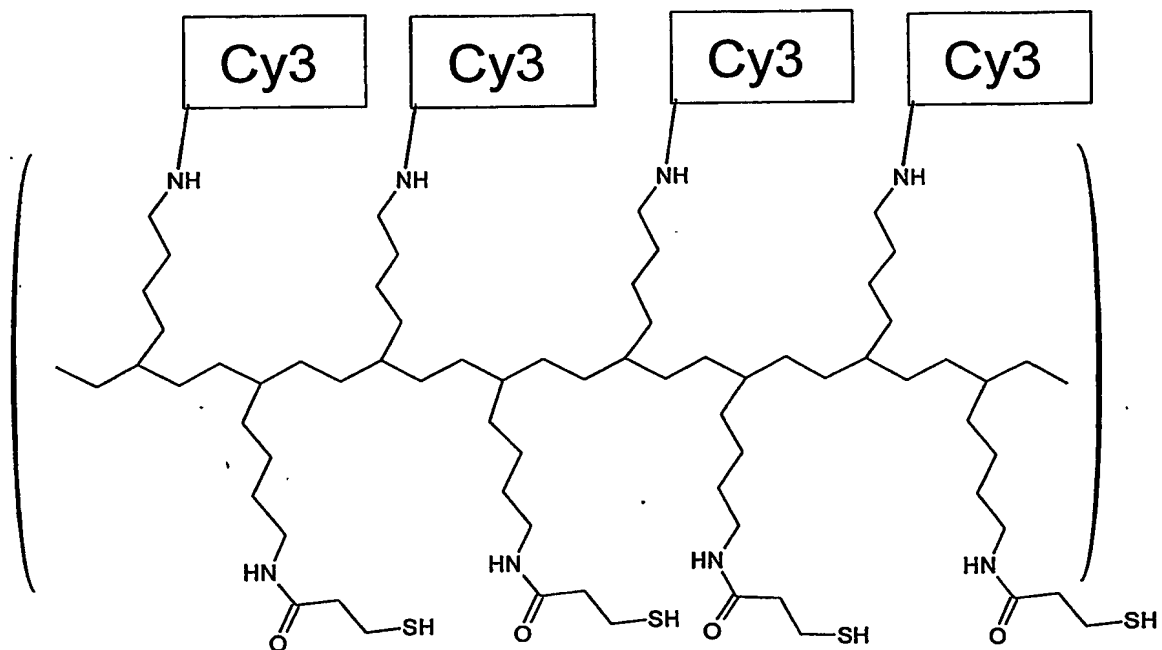
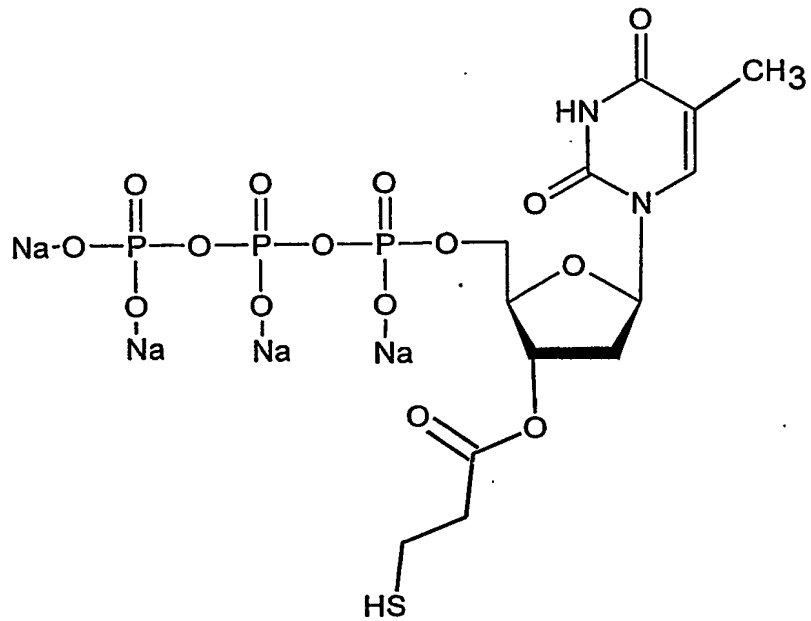
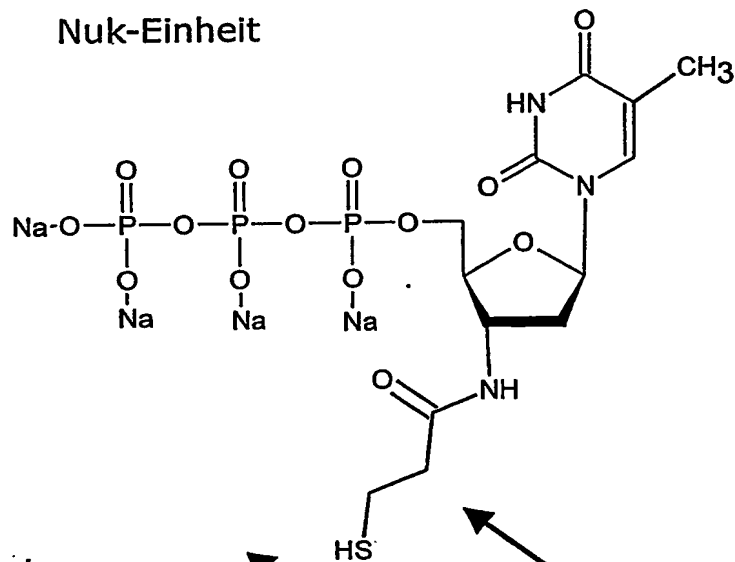


Fig. 21

A)



B)



Reaktive Gruppe als
Kopplungsstelle für
Polymer-Anteil
der Linker-Einheit

Kopplung des Linkers
an die Nuk-Einheit

Fig. 22

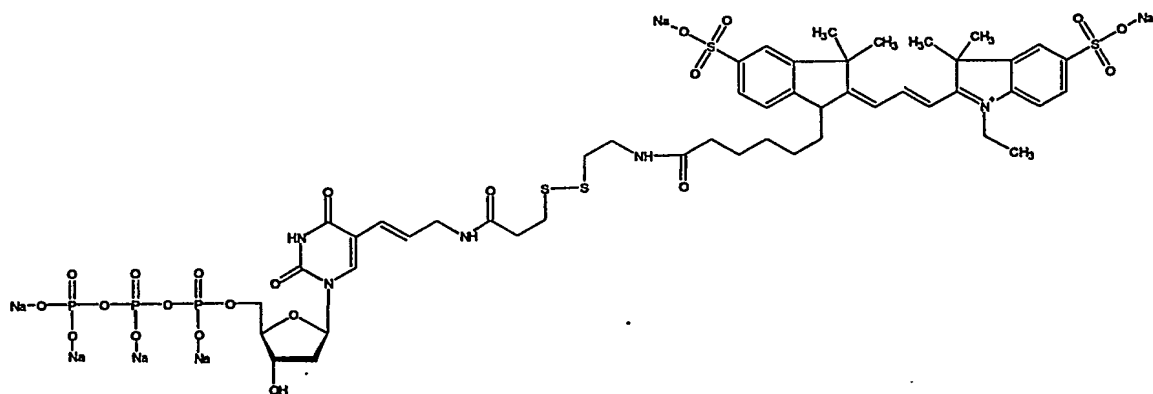


Fig. 23

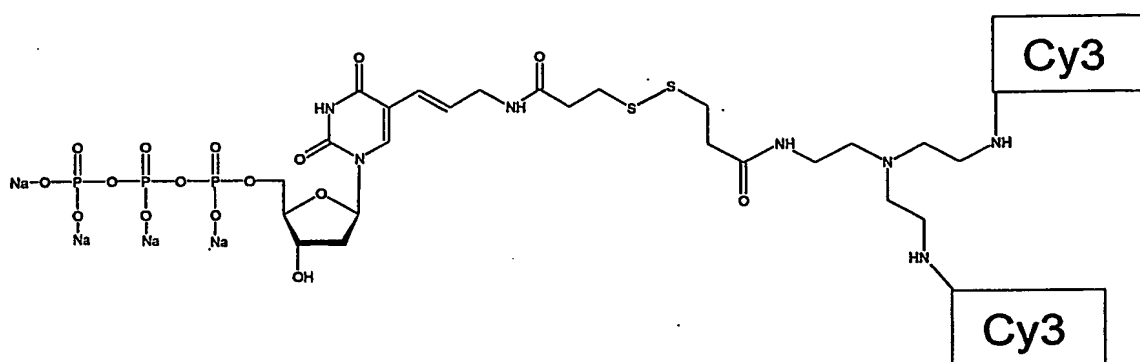


Fig. 24

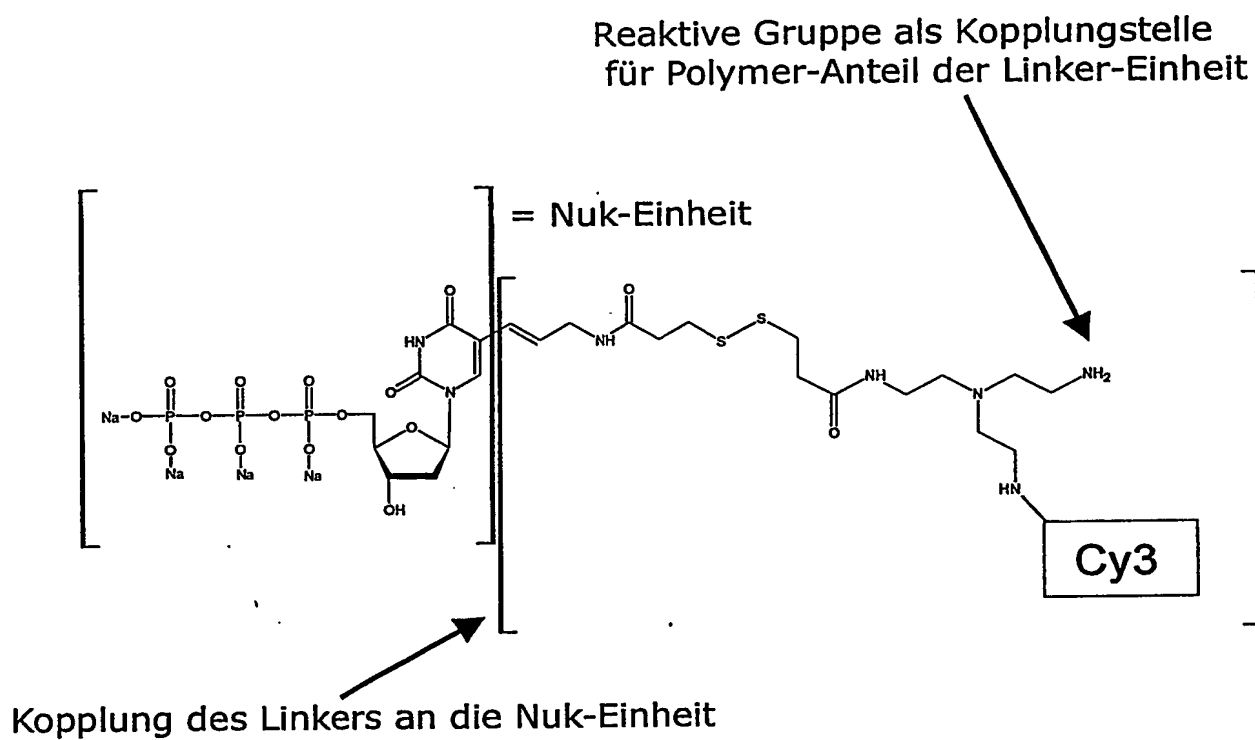
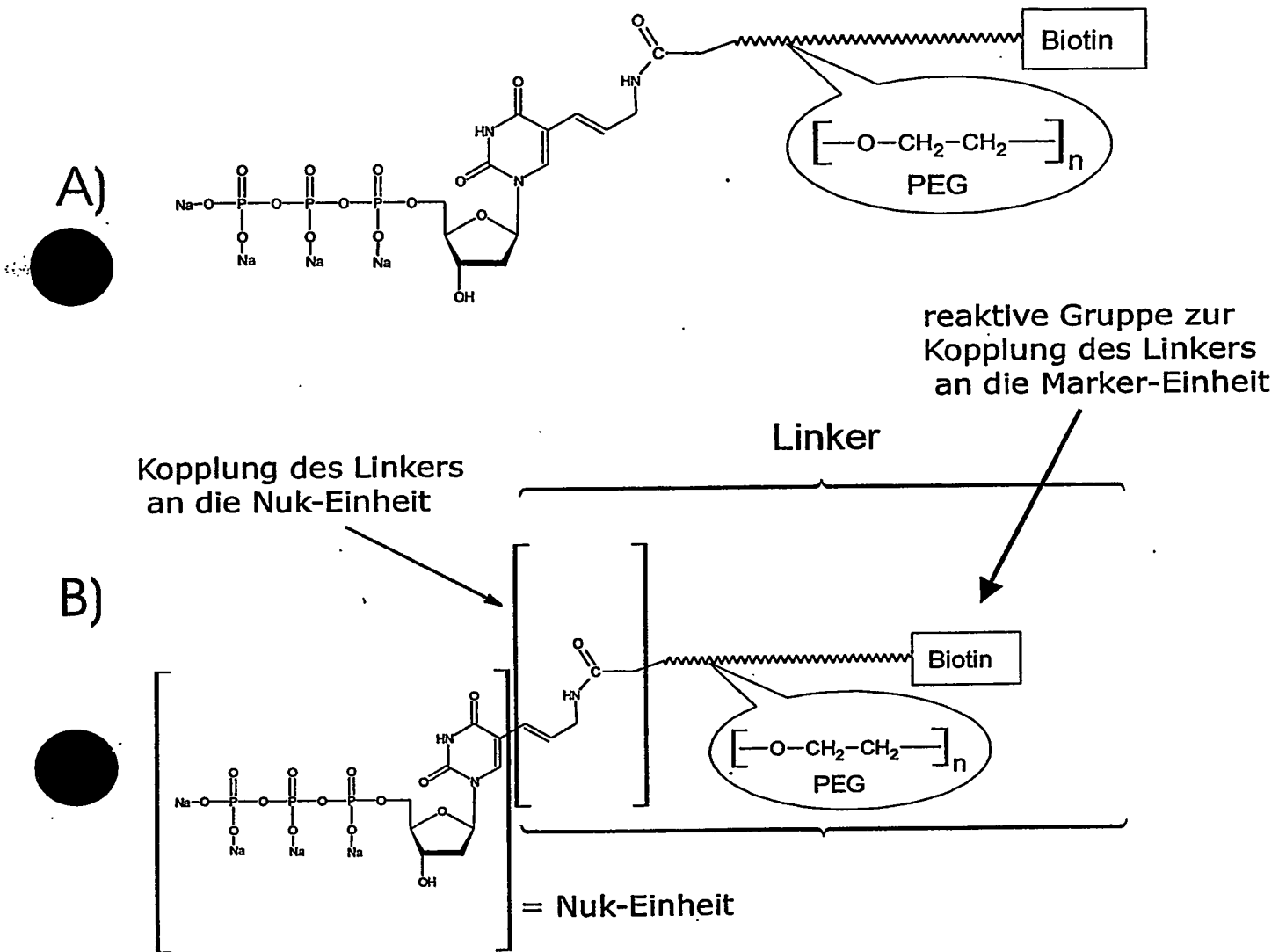


Fig. 25



Legende:

- A) Chemische Struktur der Nuk-Linker-Komponente
- B) Schematische Aufteilung in einzelne Komponenten

Fig. 26

reaktive Gruppe zur
Kopplung des Linkers
an die Marker-Einheit
oder auch
niedermolekulare Markereinheit

Kopplung des Linkers
an die Nuk-Einheit

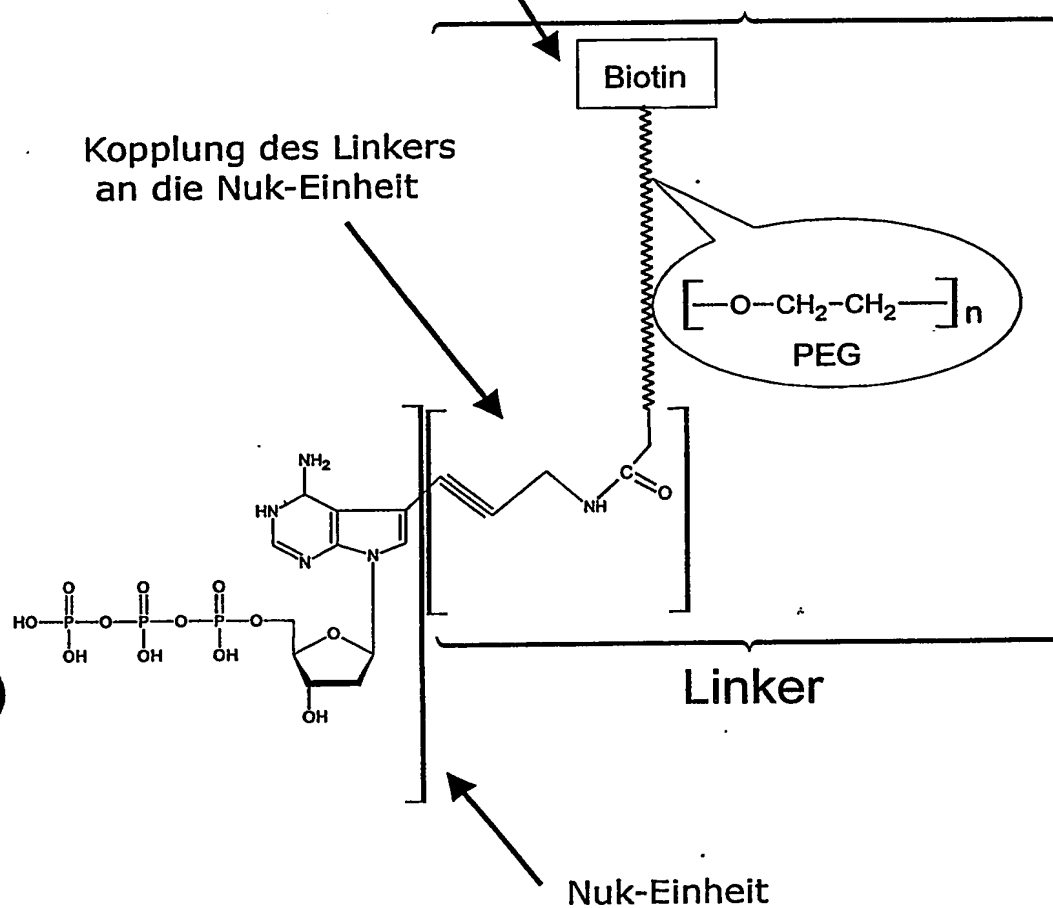


Fig. 27

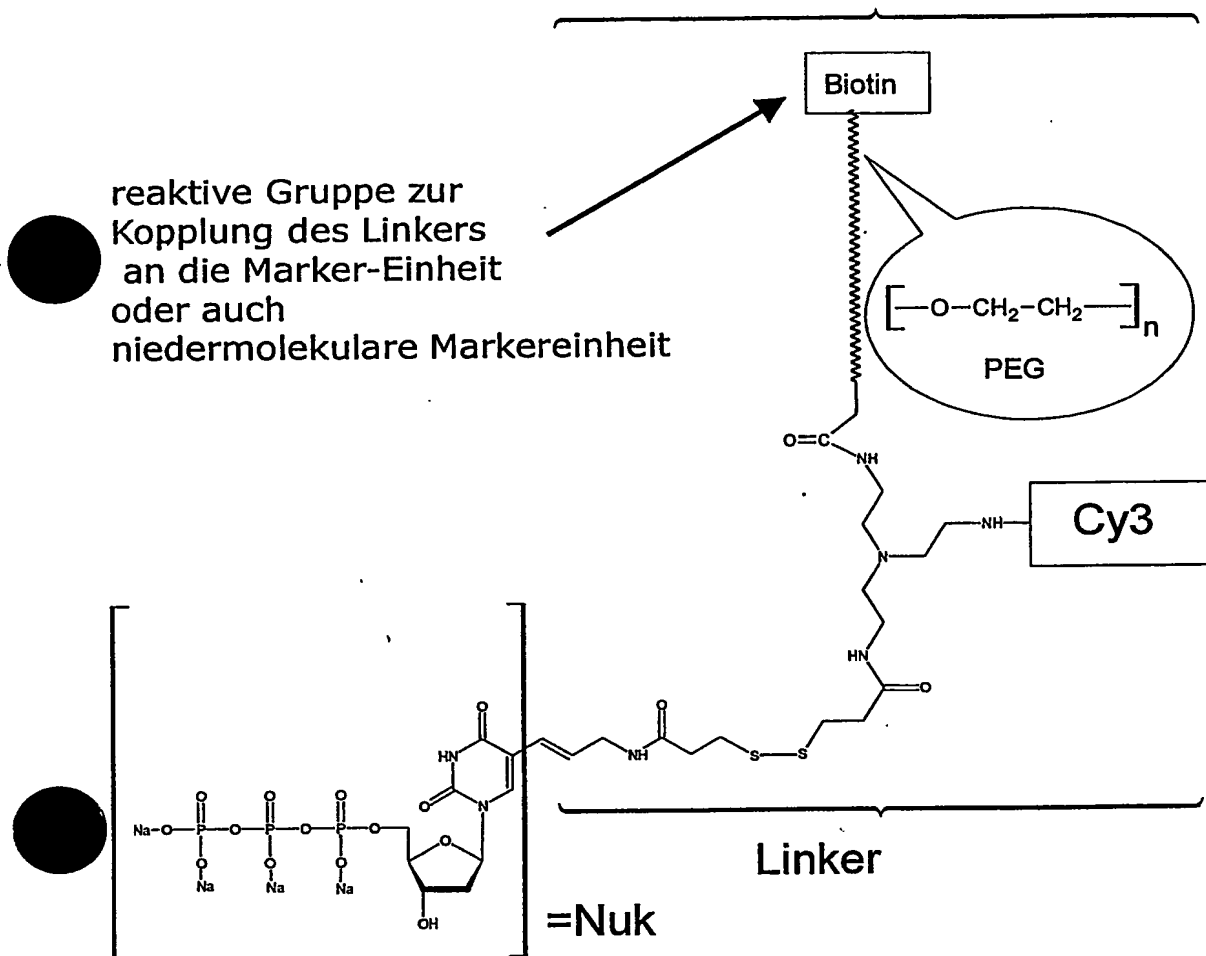


Fig. 28

reaktive Gruppe zur
Kopplung des Linkers
an die Marker-Einheit
oder auch
niedermolekulare Markereinheit

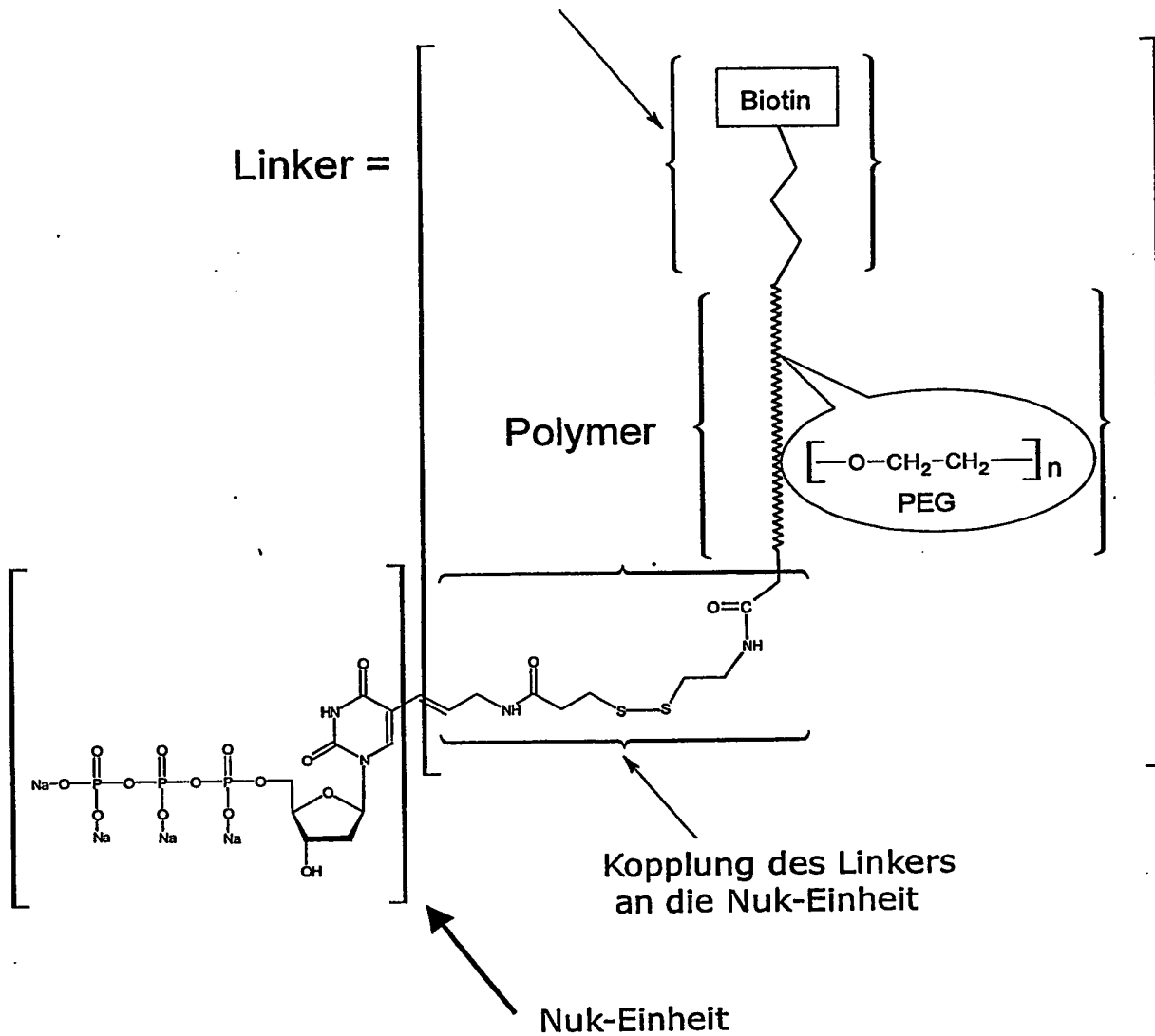
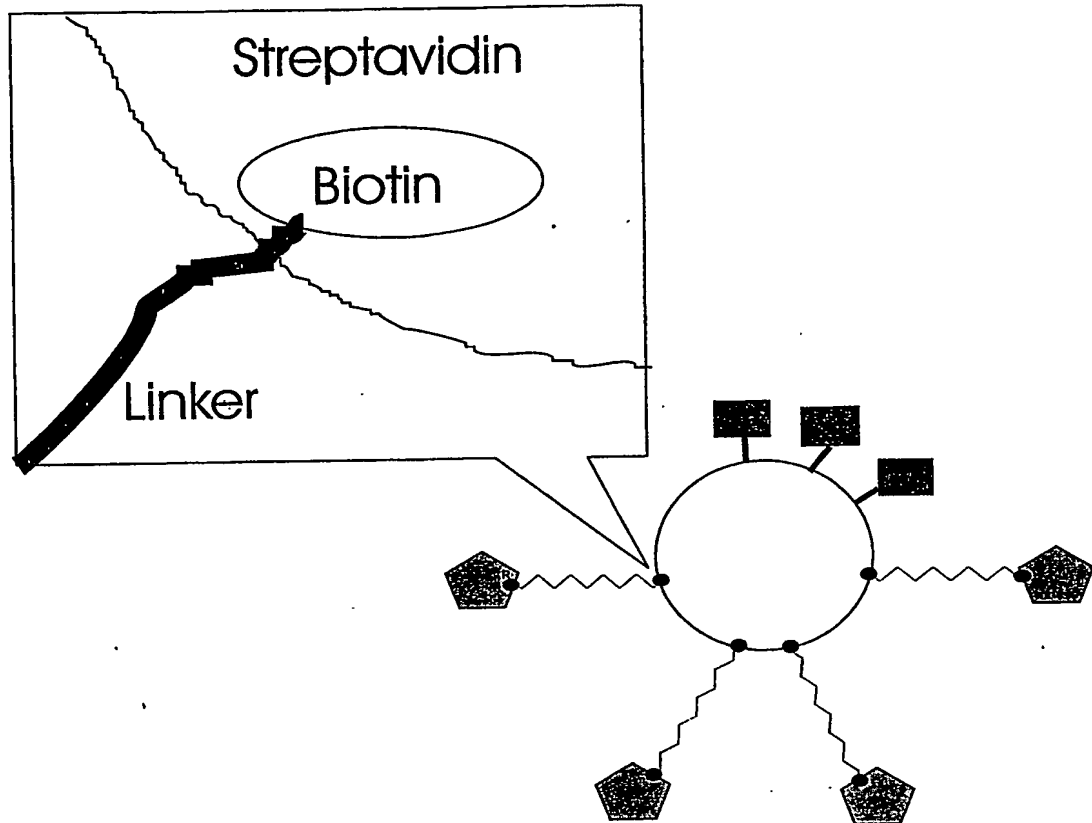


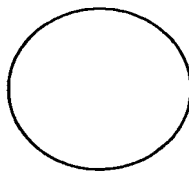
Fig. 29



Legende:



dNTP als Nuk-Einheit



Streptavidin als
Marker-Einheit

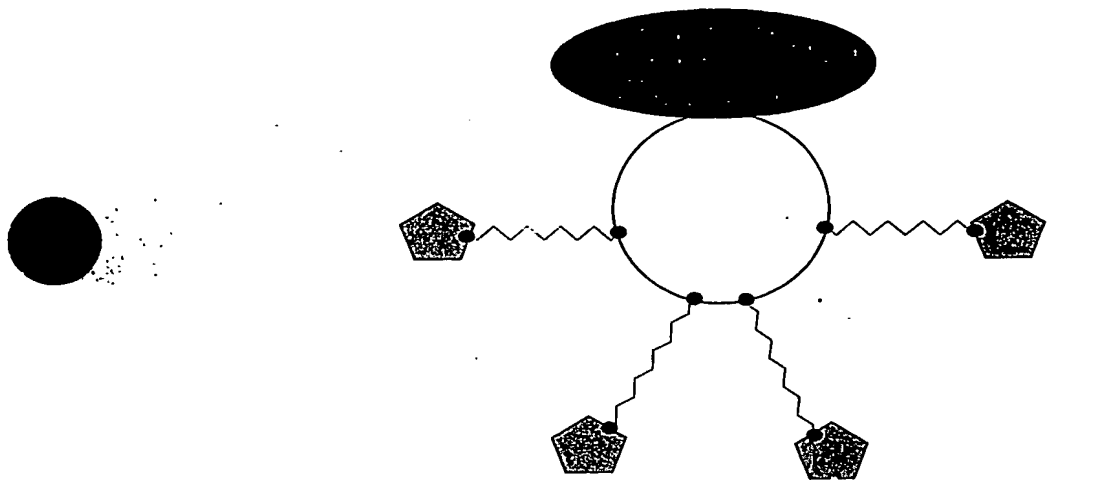


Fluoreszenzfarbstoffe



Linker-Einheit

Fig. 30



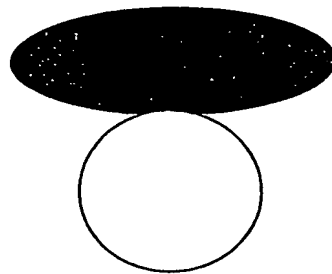
Legende:



dNTP als Nuk-Einheit

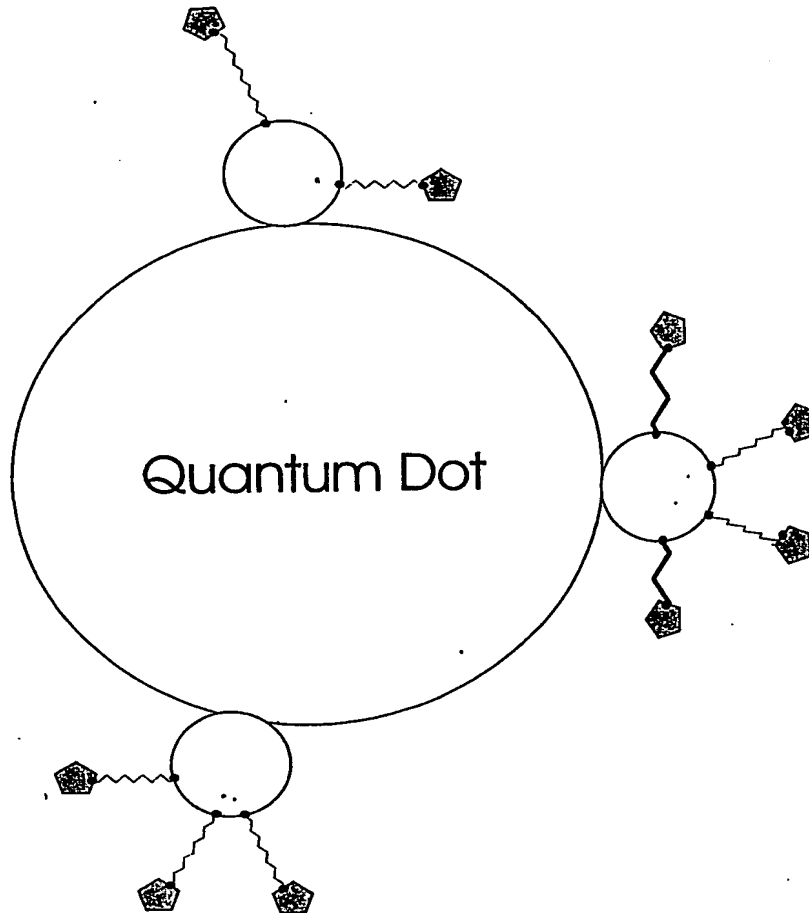


Linker-Einheit



Streptavidin-Enzymkonjugat
als Marker-Komponente

Fig. 31



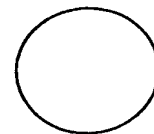
Legende:



dNTP als Nuk-Einheit

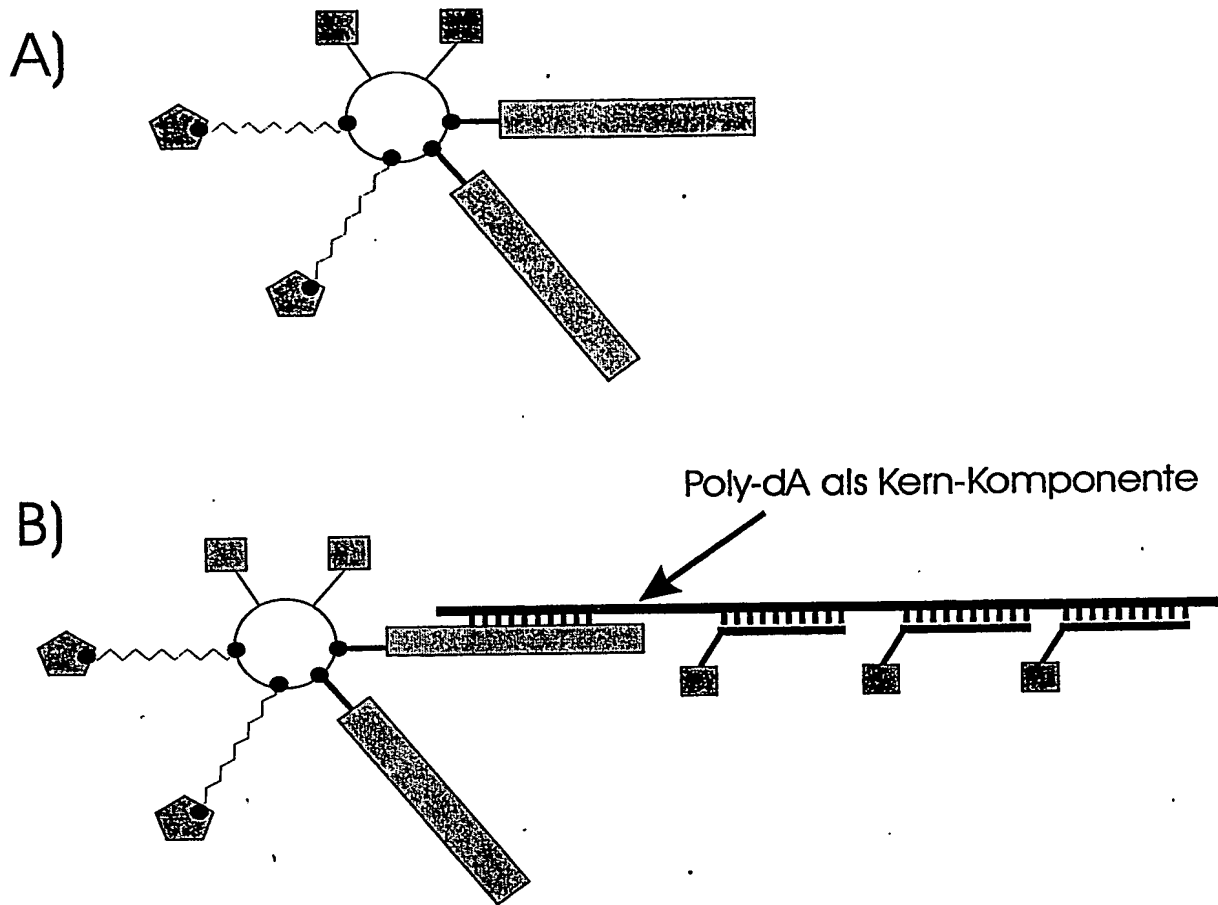


Linker-Einheit



Streptavidin gekoppelt an
Quantum Dot

Fig. 32



Legende:

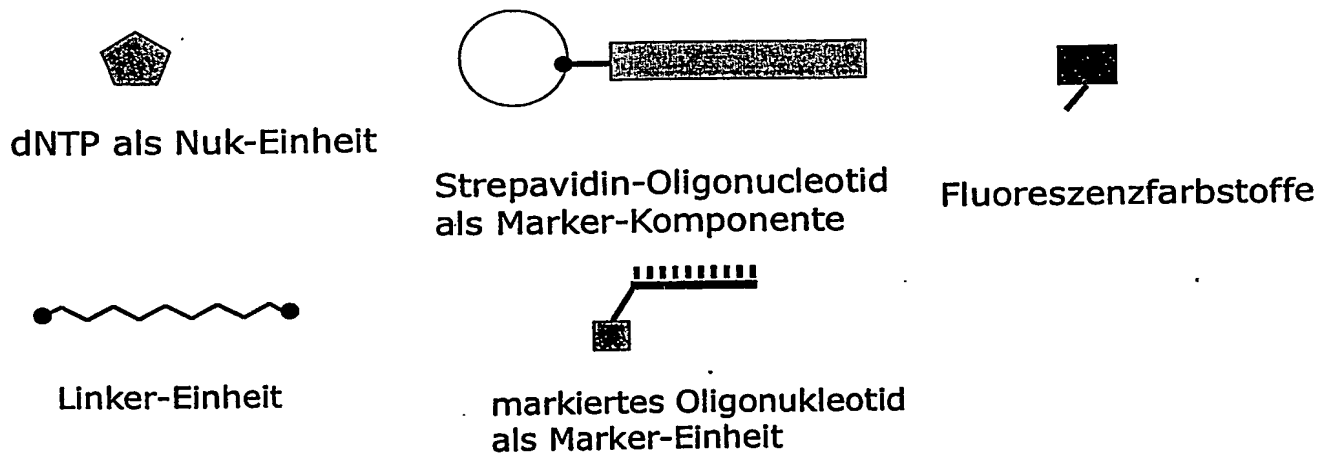
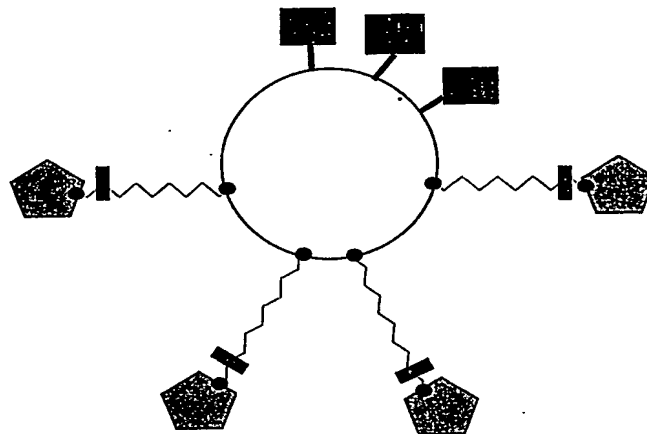


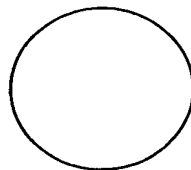
Fig. 33



Legende:



dNTP als Nuk-Einheit



Streptavidin als
Marker-Einheit

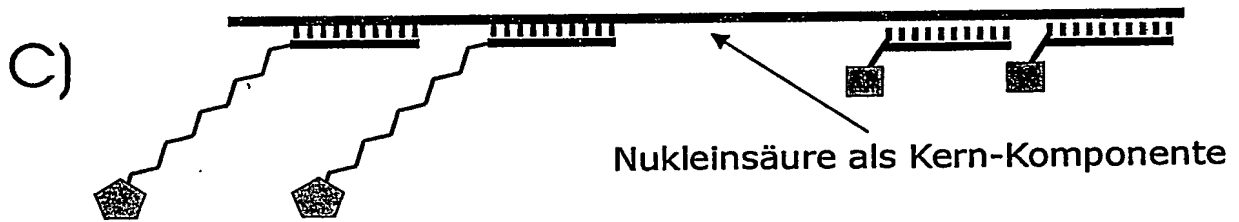
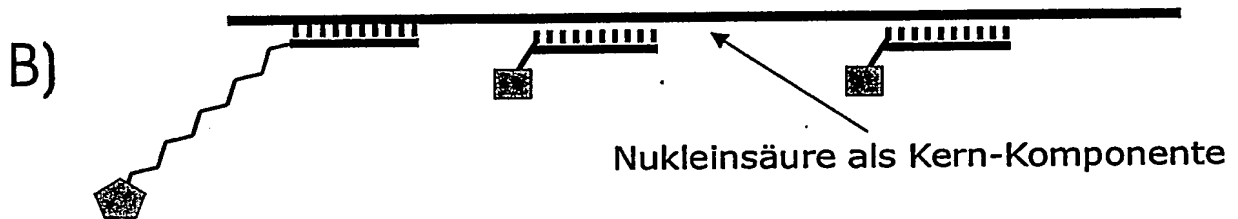
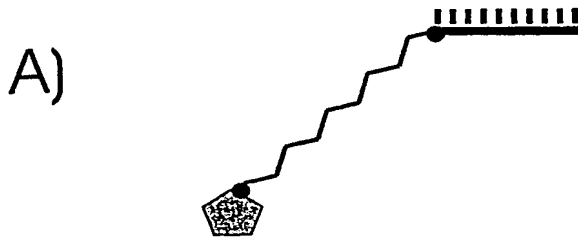


Fluoreszenzfarbstoffe




Linker-Einheit mit
einer spaltbaren Verbindung

Fig. 34



Legende:

 dNTP als Nuk-Einheit

 Oligonukleotid dT30


 Linker-Einheit

Fig. 35

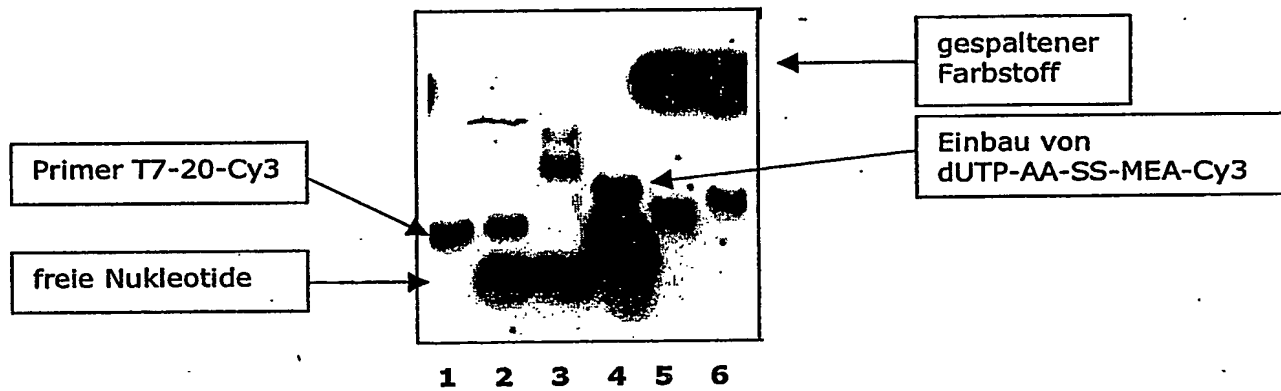


Fig. 36

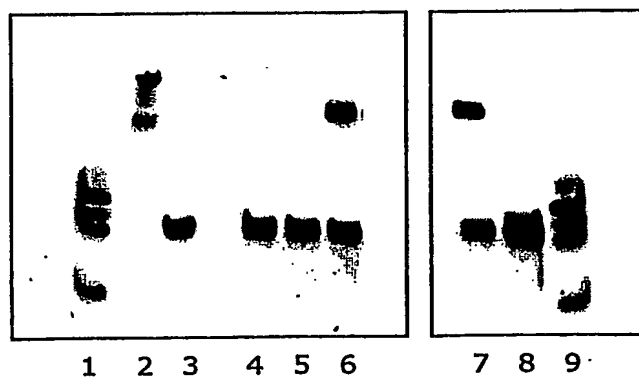


Fig. 37

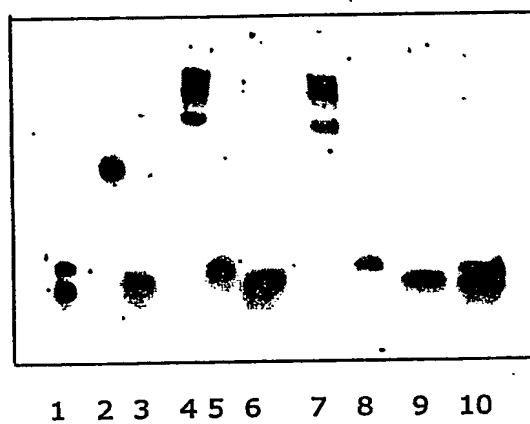
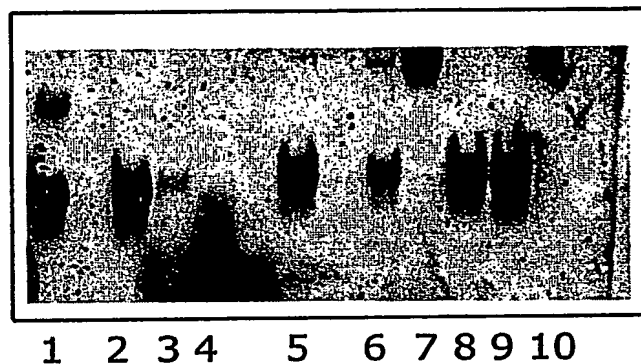


Fig. 38



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.